

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MELISSA GIOWANELLA**

**MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO VISANDO O ALIMENTO  
SEGURO NO PIMO**



**CURITIBA**

**2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MELISSA GIOWANELLA**

**MONITORAMENTO MICROBIOLÓGICO VISANDO O ALIMENTO  
SEGURO NO PIMO**

Monografia apresentada para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Ida Chapaval Pimentel

**CURITIBA**

**2009**

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Maria Aparecida Cassilha Zawadneak, por nos convidar a participar do Projeto PIMO, dando as condições para que realizássemos esse trabalho;

Aos produtores participantes do projeto, que permitiram que fizéssemos o estudo em suas propriedades;

À professora, orientadora e amiga, Ida Pimentel, por todos os bons anos de convivência e aprendizado;

À professora e amiga, Patricia do Rocio Dalzoto, por toda a disponibilidade e auxílio prestados;

À Cristiane Fugita, pela disponibilidade e doação de reagentes e meios;

Ao Leandro, pela inesgotável paciência e carinho, cujo companheirismo foi fundamental durante todo esse tempo;

Aos meus amigos da UFPR, que foram a companhia ideal para todos os anos de curso e que, espero, ainda sejam por toda a vida;

Aos meus amigos do CPM, que há tanto tempo estão ao meu lado, que nem conseguiria lembrar de alguma época em que não podia contar com eles;

Aos meus amigos do teatro, pelas intermináveis risadas e grande aprendizado;

Aos meus amigos do LabMicro, pela ajuda e pelas conversas divertidas do cotidiano;

## RESUMO

Atualmente existe uma preocupação e uma busca por um estilo de vida mais saudável, o que reflete no aumento do consumo de frutas e verduras. Esse aumento do consumo também está ligado a uma mudança de postura, caracterizada por consumidores que procuram não apenas alimentos frescos e saudáveis, mas também, alimentos mais seguros. O morango é uma fruta que tem grande apelo comercial, bastante consumido, sobretudo in natura, o que o transforma em um potencial causador de doenças transmitidas por alimentos (DTAS). A contaminação durante a produção do morango pode dar-se em qualquer momento, visto que micro-organismos fazem parte da natureza e, em condições precárias de higiene, proliferam-se rapidamente. O objetivo do presente trabalho foi identificar os micro-organismos presentes nas diversas etapas da produção do morangueiro, em duas propriedades participantes do Projeto de Produção Integrada de Morango (PIMO), localizadas em São José dos Pinhais, Paraná, visando diminuir os agentes microbiológicos que possam interferir na qualidade do produto final. Foram realizadas duas coletas para a água de irrigação (safra 2008 e 2009) e uma para mãos dos produtores, caixa e coleta e fruto (safra 2009). A análise de coliformes termotolerantes da água e do fruto foi feita através da técnica dos tubos múltiplos de acordo com a Portaria Nº 518 (25/03/2004) da ANVISA. Os fungos foram isolados de acordo com a Instrução Normativa Nº 62 (26/08/2003) do Ministério da Agricultura, com adaptações para a o isolamento dos fungos das mãos e da caixa de coleta. Todos os isolados, foram identificados por macro e micromorfologia, através da técnica de microcultivo. *Escherichia coli*, *Salmonella* sp e *Staphylococcus aureus* foram analisados de acordo com a Instrução Normativa Nº 62 (26/08/2003) do Ministério da Agricultura, com adaptações para a análise de *Staphylococcus aureus*. Em relação aos fungos, gêneros encontrados foram: *Cladosporium* e *Drechslera* na água de irrigação; *Acremonium* na caixa de coleta; *Rhizopus* e *Cladosporium* nas mãos e *Aspergillus* e *Penicillium* na caixa de coleta e nas mãos. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram encontrados com maior frequência em todas as etapas da produção, com exceção da água. Espécies de *Aspergillus* estão associadas à produção de micotoxinas e de *Penicillium* com doenças degradativas do fruto. A análise mostra que as duas propriedades apresentam água imprópria para a irrigação de hortaliças, de acordo com a resolução Nº 357 (17/03/2005) do CONAMA. *Escherichia coli* foi encontrada em todas as amostras de água e mãos, *Staphylococcus aureus* foi encontrada em mãos e caixa de coleta e não foi detectada a presença de *Salmonella* sp. Apesar do fruto não ter apresentado micro-organismos patógenos, a presença destes durante a produção indica que existe a possibilidade de contaminação, pois as propriedades não possuem normas de boas práticas na pós colheita, o que diminui a qualidade e inocuidade do fruto oferecido ao consumidor.

**Palavras-chave:** Segurança alimentar; monitoramento microbiológico; *Fragaria* sp.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – <i>Staphylococcus aureus</i> ISOLADO DE MÃOS E UTENSÍLIOS.....	59
FIGURA 2 – <i>Escherichia coli</i> ISOLADA DA ÁGUA, MÃOS E UTENSÍLIOS .....	60
FIGURA 3 – <i>Acremonium</i> sp ISOLADO DAS MÃOS, CAIXA DE COLETA E FRUTO .....	61
FIGURA 4 – <i>Aspergillus</i> sp1 ISOLADO DAS MÃOS, CAIXA DE COLETA E FRUTO .....	62
FIGURA 5 – <i>Aspergillus</i> sp2 ISOLADO DA CAIXA DE COLETA E FRUTO .....	63
FIGURA 6 – <i>Cladosporium</i> sp ISOLADO DA CAIXA DE COLETA.....	64
FIGURA 7 – <i>Drechslera</i> sp ISOLADO DA ÁGUA .....	65
FIGURA 8 – <i>Penicillium</i> sp ISOLADO DAS MÃOS, CAIXA DE COLETA E FRUTO .....	66
FIGURA 9 – <i>Rhizopus</i> sp ISOLADO DA CAIXA DE COLETA.....	67
FIGURA 10 – <i>Scopulariopsis</i> sp ISOLADO DA ÁGUA .....	68

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES PRESENTES NAS AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZADAS PARA A IRRIGAÇÃO NAS PROPRIEDADES LOCALIZADAS EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS -PR (SAFRA 2008 E 2009) .....42

TABELA 2 – NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TOTAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS DOS FRUTOS DO MORANGO COLETADOS NAS PROPRIEDADES LOCALIZADAS EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS -PR (SAFRA 2008 E 2009) .....44

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	9
<b>2. OBJETIVOS</b>	11
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b>	12
3.1 SEGURANÇA ALIMENTAR	12
3.2 MORANGO E A SEGURANÇA ALIMENTAR	13
3.3 VEÍCULOS DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS NA PÓS-COLHEITA DO MORANGO	14
3.3.1 Água	15
3.3.2 Mãos e Utensílios	17
3.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	19
3.5 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE INTERESSE EM ALIMENTOS	20
3.5.1 Bactérias	20
3.5.1.1 <i>Coliformes Termotolerantes e Escherichia coli</i>	20
3.5.1.2 <i>Salmonella spp</i>	22
3.5.1.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	22
3.5.2 Fungos	23
3.6. PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS (PIF) – OPÇÃO PARA UM FRUTO MAIS SEGURO	26
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	28
4.1. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO	28
4.2. PREPARO DAS AMOSTRAS	29
4.2.1. Fruto	29
4.2.2. Microbiota das mãos e utensílios	29
4.3. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES	29
4.4. ISOLAMENTO DOS FUNGOS	32
4.4.1. Água	32
4.4.2. Fruto	32
4.4.3. Mãos e utensílios	32
4.4.4. Identificação dos isolados	33
4.4.4.1. Técnica do microcultivo	33

4.5. ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES .....	34
4.5.1. Água e fruto .....	33
4.6. DETECÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> .....	34
4.6.1. Água, fruto, mãos e utensílios .....	34
4.6.2 Provas Bioquímicas para <i>Escherichia coli</i> .....	35
4.7. DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. ....	36
4.7.1. FRUTO, MÃOS E UTENSÍLIOS.....	36
4.8. DETECÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
4.8.1. Mãos e utensílios .....	37
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
5.1. ISOLAMENTO DOS FUNGOS.....	39
5.1.1. Água .....	39
5.1.2. Mãos e Utensílios.....	40
5.1.3. Fruto .....	40
5.2. ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES .....	41
5.2.1. ÁGUA.....	41
5.2.2. Fruto .....	43
5.3. DETECÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> .....	45
5.3.1. Água .....	45
5.3.2. Mãos e Utensílios.....	46
5.3.3. Fruto .....	47
5.4. DETECÇÃO DE <i>Salmonella</i> spp. ....	47
5.5. DETECÇÃO DE <i>Staphylococcus aureus</i> .....	47
6. PROPOSTAS PARA MINIMIZAÇÃO DA CARGA MICROBIANA .....	48
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>52</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>59</b>
MANUAL DE BOAS PRÁTICAS NA PÓS COLHEITA DO MORANGO.....	69



## 1. INTRODUÇÃO

O ritmo de vida dos tempos modernos tem elevado a incidência de doenças relacionadas aos maus hábitos alimentares e ao *stress*, como obesidade e doenças cardíacas. Isso tem levado a população a questionar seu cotidiano e, principalmente, suas escolhas em relação à alimentação.

Atualmente existe uma preocupação e uma busca por um estilo de vida mais saudável, o que reflete no aumento do consumo de frutas e verduras. Esse aumento do consumo também está ligado a uma mudança de postura, caracterizada por consumidores que procuram não apenas alimentos frescos e saudáveis, mas também, alimentos mais seguros.

A consciência de que o consumo de alimentos *in natura* traz inúmeros benefícios em relação aos industrializados já está consolidada. Porém, o fato de que frutas e vegetais podem ser causadores de doenças é algo que até pouco tempo era subestimado, mas agora está ganhando espaço e influência nas escolhas do cotidiano da população.

O morango é uma fruta que tem grande apelo comercial, com propriedades organolépticas bastante atraentes. É um fruto bastante consumido, sobretudo *in natura*, o que o transforma em um potencial causador de doenças transmitidas por alimentos (DTAS).

Por possuir grandes teores de açúcares, água e estar completamente exposto, sem a proteção de uma casca, por exemplo, ele oferece as condições ideais para a proliferação de micro-organismos como parasitas, bactérias e fungos, que contaminam e deterioram o fruto. Quando o dano se dá de forma a descaracterizar o produto, afetando sua aparência ou propriedades sensoriais, o prejuízo geralmente restringe-se ao produtor, que fica impossibilitado de vender sua safra. Mas nem sempre a contaminação é visível, e se não forem tomadas as devidas precauções e medidas sanitizantes antes do consumo, os prejuízos se estendem a saúde do consumidor.

A contaminação durante a produção do morango pode dar-se em qualquer momento, visto que micro-organismos fazem parte da natureza e em condições precárias de higiene, proliferam-se rapidamente. Desde a qualidade

da água utilizada para a irrigação, até a embalagem utilizada para o acondicionamento do produto, todas as etapas do morangueiro são potenciais pontos de contaminação e devem ser monitoradas e avaliadas em relação ao risco microbiológico.

O consumidor cada vez mais exige um controle de qualidade rigoroso, que ofereça um fruto de inocuidade garantida. Dentre as tantas opções ofertadas no mercado, o produto com certificação se destacará dos demais.

Atualmente, busca-se uma visão diferenciada da produção, de forma a buscar procedimentos seguros que aumentem a rentabilidade e qualidade do morango. O projeto PIMO no Estado do Paraná (Produção Integrada de Morango) reúne produtores e pesquisadores de diversas áreas, que analisam diversos fatores intrínsecos à produção do morango, buscando soluções que tragam benefícios para o produtor e consumidor.

Assim, o objetivo desse trabalho é identificar os micro-organismos patogênicos ao homem, presentes nas diversas etapas da cadeia produtiva do Sistema de Produção Integrada do morango (PIMO). Como também, propor soluções simples, que visem diminuir a carga microbiana que possa vir a contaminar o fruto.

## 2. OBJETIVOS

Este projeto visa identificar os micro-organismos patogênicos ao homem, presentes nas diversas etapas de produção do morango. Também propor soluções simples, que visem diminuir os agentes microbiológicos que possam interferir na qualidade do produto final.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar qualidade microbiológica da água de irrigação através do exame colimétrico da água;
- Isolar e identificar os agentes microbiológicos encontrados na água de irrigação, mãos e utensílios durante as etapas de produção;
- Propor soluções simples e naturais que visem melhorar a qualidade fitossanitária do produto.
- Adaptar um guia de procedimentos a ser utilizado no dia a dia da produção.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 SEGURANÇA ALIMENTAR

Existe uma tendência mundial para usar alimentos cada vez mais naturais, valorizando o sabor original dos produtos, onde o consumidor, disposto a pagar mais pela qualidade, apresenta um nível de exigência cada vez maior. É neste cenário que surgem os alimentos processados minimamente, que unem a praticidade e a conveniência, proporcionando uma economia de tempo no preparo dos alimentos (MORAES *et al*, 2008).

O consumo de frutas no Brasil e no mundo tem crescido a taxas elevadas. No Brasil, no período 1994-1998, o aumento foi de 12% a.a. (NASCENTE, 2003). Juntamente com o aumento de consumo no setor de “hortifruti”, houve o incremento na identificação do número de doenças provenientes de alimentos, associadas principalmente à ingestão de frutas e hortaliças. (TIBOLA; FACHINELLO, 2004).

Os consumidores estão conscientes sobre a importância da seleção de alimentos saudáveis na prevenção de doenças e na melhoria da qualidade de vida, sendo mais exigentes com relação à qualidade e inocuidade (TIBOLA; FACHINELLO, 2004).

O termo segurança alimentar, empregado mundialmente com o significado de alimentos em quantidade para todos, sem perigos à saúde do consumidor, conquista destaque nos cenários sócio-políticos. Perigo, genericamente é conceituado como a presença inaceitável de contaminantes biológicos, químicos ou físicos na matéria prima ou nos produtos semi-acabados ou acabados e em não conformidade com o Padrão de Identidade e Qualidade ou Regulamento Técnico estabelecido para cada produto (MATTOS, 2004).

Um alimento ausente de qualquer agente patogênico ou de suas toxinas caracteriza-se por uma atribuição primária de segurança na manipulação de alimentos. Assim, alimentos com qualidade microbiológica aceitável garantem produto seguro e sem risco ao consumidor (SILVA, 2006).

### 3.2 MORANGO E A SEGURANÇA ALIMENTAR

O morango (*Fragaria* sp.) é uma planta herbácea, rasteira e perene da família Rosaceae, propagada por via vegetativa, através de estolhos. A parte comestível é um pseudo-fruto, originário do receptáculo floral que se torna carnoso e suculento. Seu cultivo é bastante desenvolvido em vários países do mundo, especialmente nos de clima temperado (FERLA *et al.*, 2007).

Os Estados Unidos são o principal produtor mundial, com cerca de 750.000 toneladas, e também detém a maior produtividade de 40 t ha<sup>-1</sup>. A Espanha, Itália e Estados Unidos são os maiores exportadores, enquanto que a Alemanha é o maior importador (RESENDE *et al.*, 1999). No Brasil a produção nacional, está em torno de 100 mil toneladas, concentradas, principalmente na Região Sudeste e Sul (EMBRAPA, 2009).

O Município de São José dos Pinhais está entre os três maiores produtores do Estado do Paraná, ao lado de Araucária (ambas situadas na Região metropolitana de Curitiba), e Jaboti (Norte Velho). Em 2007 foram plantadas no município 3 milhões de mudas em uma área de 70 hectares. A estimativa de produção para 2007 foi de aproximadamente 3 mil toneladas do produto. Baseada quase que totalmente na agricultura familiar (aproximadamente 95% do total produzido), a produção de morango está concentrada nas regiões da Colônia Murici, Rio Pequeno, Marcelino, Roça Velha, Gamelas, Contenda, Faxina e Campestre da Faxina. Cerca de 90% da produção do município é convencional e os outros 10%, de morango orgânico. A fruta tem grande aceitação em outros Estados, sendo o morango produzido pela Cooperativa dos produtores de Morango do Paraná enviado para Santa Catarina, São Paulo, Rio de Janeiro e Belém (Pará) (SCHWONKA, 2007).

A cultura do morangueiro é de grande importância para as regiões que o cultivam, pois gera sustento para as famílias dos produtores e de seus empregados (MORAES, 2005).

Por ser um alimento preferencialmente consumido na forma *in natura*, existe uma preocupação crescente em produzir produtos que possuam

características sensoriais, como cor e paladar, que sejam atraentes e, ao mesmo tempo, seguros. Isso implica na utilização restrita de agrotóxicos e submissão destes a critérios rigorosos de qualidade fitossanitária (MATTOS, 2004).

O morango é um fruto altamente perecível, apresentando alta taxa respiratória e curta vida pós-colheita. Os principais processos de deteriorização estão relacionados aos altos teores de umidade, açúcares e ácidos e proliferação de microrganismos patogênicos, que causam consideráveis danos durante o transporte, o amadurecimento, a pós-colheita e o armazenamento à temperatura ambiente e sob refrigeração (SILVA, 2007).

Existem condições extrínsecas e intrínsecas ao alimento que podem permitir ou favorecer o crescimento de micro-organismos deterioradores e até patogênicos (PORTE; MAIA, 2001). A produtividade e a qualidade dos frutos de morango são muito influenciadas pelo fotoperíodo, temperatura, período de dormência, pragas, doenças, condições do solo, adubação, flutuações na umidade do ar e de solo, entre outros. Dentre os fatores acima citados, doenças causadas por fitopatógenos como fungos, bactérias, fitoplasmas, vírus e nematóides, afetam direta e indiretamente a cultura, podendo determinar o sucesso ou o fracasso do produtor de morango. Fatores ambientais, genéticos e biológicos afetam, diretamente ou através de suas interações, a sanidade da planta (UENO, 2004). Estudos realizados na Europa demonstram que o primeiro fator de estímulo à compra de alimentos é a segurança sanitária, entendendo como necessidade essencial o fato da fruta apresentar a menor quantidade possível de resíduos de agrotóxicos e contaminação microbiológica (GUEDES; SENA; TOLEDO, 2007).

### 3.3 VEÍCULOS DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS NA PÓS-COLHEITA DO MORANGO

A qualidade final de determinado produto, a duração e o sucesso de um processo de conservação resulta de um conjunto de condições proporcionadas

antes, durante e após a colheita. A seleção de cultivares com boas características de qualidade e conservação, os fatores de produção afetam não só o crescimento da cultura, mas as características de qualidade interna do produto colhido (KAYS, 1999)

A contaminação microbiana do produto final depende, até certo ponto, da microbiota inicial do produto fresco e também daquela adquirida durante seu manuseio e elaboração. Dessa forma, o aumento da microbiota será significativamente maior quando os microrganismos encontrarem condições favoráveis para seu crescimento e multiplicação (GORNY, 2001).

Em frutas frescas, fungos filamentosos e leveduras fermentativas frequentemente constituem a microbiota predominante, em razão do pH, que é geralmente abaixo de 4,0. Ocasionalmente, patógenos podem estar presentes em razão do uso de água contaminada, fertilizantes orgânicos preparados inapropriadamente, presença de animais e manipuladores infectados (VANETTI, 2004).

A maior parte da microbiota contaminante das frutas reside na parte externa das frutas, sendo o seu interior praticamente estéril, a menos que haja alguma ruptura de continuidade por lesões em alguma parte da casca. A microbiota que contamina os produtos de frutas é proveniente das condições da matéria prima e da lavagem a qual esta é submetida, além das condições higiênico sanitárias dos manipuladores, equipamentos e ambiente industrial em geral (TORREZAN, 2000).

A higienização nas indústrias de alimentos visa basicamente preservar a pureza e a qualidade microbiológica dos alimentos manipulados, sem ocasionar riscos à saúde do consumidor (ANDRADE; MACEDO, 1996).

Nas indústrias e estabelecimentos processadores de alimentos, a higienização frequentemente não é procedimentada ou efetuada corretamente (ANDRADE; MACEDO, 1996).

### 3.3.1 Água

Os constituintes físicos, biológicos e químicos da fonte de água são básicos para a determinação da qualidade da água. Estes constituintes ou

parâmetros apresentam propriedades que servem para definir a qualidade da água para os diversos usos (agropecuário e industrial, abastecimento público, preservação da vida aquática, recreação, transporte) (DOTTO, 1993).

As preocupações quanto aos níveis de qualidade, contaminação das águas e manutenção dos recursos hídricos assumem importância, à medida que a água é destinada ao consumo humano ou à transformação econômica. Água não potável, ou seja, contaminada de alguma forma por agentes patogênicos nocivos pode por em perigo a saúde e comprometer o desenvolvimento das comunidades humanas (MATTOS; SILVA, 2002).

Para abastecer um centro urbano, uma região agropecuária ou uma área industrial é necessária água de qualidade específica. Na agricultura, seus setores diversos também exigem diversos requisitos de qualidade de água, relacionados às características biológicas, físicas e químicas. Dependendo da composição e da influência destes requisitos pode-se produzir um impacto desfavorável sobre o solo, regime hídrico, desenvolvimento da planta, desempenho satisfatório dos equipamentos de irrigação e, inclusive, na saúde pública através de ação de agentes patogênicos que estão ligados à água (DOTTO, 1993).

A agricultura mundial depende do fornecimento de água em quantidade e qualidade para a produção de alimentos, via sistemas de irrigação. Com frequência a agricultura irrigada utiliza águas de açudes, arroios, lagoas e esses podem apresentar contaminantes biológicos como coliformes de origem fecal quando associada a descargas de esgotos domésticos ou até mesmo à presença de animais próximos a essas áreas (SOUTO, 2005).

Na irrigação, o risco potencial da má qualidade da água depende da natureza, do tipo e quantidade dos fatores de qualidade de água e, conseqüentemente, do grau de impacto sobre o desempenho satisfatório do sistema de irrigação, do desenvolvimento da cultura, manutenção do solo, assim, como a saúde pública (DOTTO, 1993).

Uma das mais perigosas formas de contaminação da água, disseminando doenças, ocorre quando micro-organismos presentes em fezes humanas penetram no sistema de abastecimento de água, devido a falhas no processo de tratamento, ou por possíveis fontes de contaminação no sistema



de distribuição. Muitas doenças são perpetuadas pela rota fecal – oral de transmissão, onde patógenos se abrigam nas fezes humanas ou de animais, sendo veiculados pela água contaminada e ingeridos. Exemplos de doenças, tais como, febre tifóide e cólera, são causadas por bactérias que se alojam somente nas fezes humanas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

A avaliação da presença de organismos patogênicos na água é determinada pela presença ou ausência de um organismo indicador e sua respectiva população. O isolamento e identificação de cada tipo de micro-organismo exige uma metodologia diferente e a ausência ou presença de um patógeno não exclui a presença de outros (BETTEGA *et al*, 2006). Existem diversos sistemas de classificação de qualidade da água de irrigação. No Brasil, utiliza-se como parâmetro a Resolução CONAMA nº 357, de março de 2005.

O controle da qualidade da água produzida e distribuída pelos sistemas de abastecimento de água tem sido feito, nas últimas décadas, através de análises laboratoriais da água em amostras provenientes das diversas partes que compõem os sistemas, pesquisando a presença ou a ausência de bactérias do grupo coliforme, consideradas, até pouco tempo, como um ótimo indicador da contaminação da água por agentes patogênicos. Porém, nos últimos anos, surgiram novos desafios no campo do controle de doenças de veiculação hídrica associadas ao tratamento e ao abastecimento de água (TEIXEIRA *et al*, 2002).

A manutenção da qualidade de água garante a saúde e o desenvolvimento das comunidades humanas. Água sem qualidade, ou seja, contaminada por algum agente patogênico pode conduzir a prejuízos na saúde ou mesmo levar a outros efeitos negativos (MATTOS; SILVA, 2002).

### 3.3.2 Mãos e Utensílios

A forma mais usual para comprovar as condições de higiene dos ambientes, equipamentos, utensílios e manipuladores, consiste em inspecioná-los quanto à contaminação microbiológica, após serem submetidos ao

processo de higienização. Sabe-se que a limpeza aparente pode induzir a erros e dar falsa sensação de segurança (JÚNIOR *et al.*, 2004).

O termo manipulador de alimento corresponde a qualquer indivíduo que entre em contato com o alimento nas etapas de produção, processamento, embalagem, armazenamento, transporte, distribuição e venda (SOARES *et al.*, 2006).

A microbiota das mãos e roupas dos manipuladores pode ser oriunda do solo, água, poeira e outros ambientes. Outra fonte importante são as fossas nasais, a boca e a pele. Em condições muito precárias de higiene também os micro-organismos do trato gastrointestinal podem contaminar as mãos dos manipuladores e, conseqüentemente, os alimentos por eles preparados (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A contaminação cruzada ocorre quando o micro-organismo é transferido das mãos dos manipuladores, de uma superfície, ou de um alimento para outro. Os principais fatores relacionados com a contaminação cruzada são as superfícies de contato, equipamentos e mãos não higienizadas corretamente, panos de limpeza contaminados, acréscimo de ingredientes crus nas preparações e fluxo cruzado do processo produtivo (SOARES *et al.*, 2006).

Muitos patógenos podem ser transferidos para frutas frescas e vegetais por trabalhadores que colhem, embalam ou manuseiam o produto. A falta de higiene das pessoas que trabalham com alimentos, principalmente quando não lavam as mãos depois de utilizar o banheiro, tem sido a causa de muitos surtos de doenças causadas pela ingestão de alimentos (RANGARAJAN, 2009). Manipuladores sem higiene pessoal adequada podem causar a contaminação do alimento e das superfícies. Fatores que contribuem com este tipo de contaminação são: higienização inadequada das mãos, falar, tossir e espirrar sobre o alimento (SOARES *et al.*, 2006). Trabalhadores doentes ou que tem as mãos contaminadas por micro-organismos podem passar patógenos para o produto (RANGARAJAN, 2009).

As instalações e equipamentos devem ser de fácil limpeza e sanitização. Caso não sejam limpos adequadamente permitirão a permanência de bactérias e fungos. Estes poderão entrar em contato com o alimento, vindo a tornar-se um problema grave (SOARES *et al.*, 2006). Utensílios como

recipientes, bandejas, facas, tábuas, moedores etc., têm papel importante como fonte de contaminação (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A detecção e rápida correção das falhas no processamento dos alimentos, bem como a adoção de medidas preventivas, são hoje a principal estratégia para o controle de qualidade desses produtos (ALMEIDA *et al*, 1995).

### 3.4 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

A ocorrência de Doenças Transmitidas por Alimentos – DTA, vem aumentando de modo significativo em nível mundial. Vários são os fatores que contribuem para a emergência dessas doenças, dentre os quais se destacam: o crescente aumento das populações, a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos, o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala. Contribui ainda, o deficiente controle dos órgãos públicos e privados, no tocante à qualidade dos alimentos ofertados às populações (BRASIL, 2009).

A distribuição das DTAS é universal. A incidência varia de acordo com diversos aspectos: educação, condições sócio-econômicas, saneamento, fatores ambientais e culturais (BRASIL, 2009).

A maioria das doenças resulta da ingestão de alimento ou água contaminada com micro-organismos patogênicos ou suas toxinas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

O perfil epidemiológico das doenças transmitidas por alimentos no Brasil ainda é pouco conhecido. Somente alguns estados e/ou municípios dispõem de estatísticas e dados sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos mais frequentemente implicados, população de maior risco e fatores contribuintes (BRASIL, 2009).

Os sintomas mais comuns de DTA são vômitos e diarreias, podendo também apresentar dores abdominais, dor de cabeça, febre, alteração da visão, olhos inchados, dentre outros. Para adultos saudáveis, a maioria das DTA

dura poucos dias e não deixa sequelas; para as crianças, as grávidas, os idosos e as pessoas doentes, as consequências podem ser mais graves, podendo inclusive levar à morte (BRASIL, 2004).

### 3.5 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES DE INTERESSE EM ALIMENTOS

Micro-organismos indicadores são grupos ou espécies de micro-organismos que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deteriorização potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

#### 3.5.1 Bactérias

Bactérias pertencentes ao Domínio *Bacteria*, são organismos caracterizados por serem procariotos unicelulares constituídos por paredes celulares de peptideoglicano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Considerando o número total de espécies bacterianas existentes na natureza, relativamente poucas são as importantes para os alimentos (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Dados disponíveis de surtos apontam como agentes mais frequentes os de origem bacteriana e dentre eles, *Salmonella* spp, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* (BRASIL, 2009).

Segundo Sillos e Neto (2004), os principais agentes bacterianos relacionados às doenças veiculadas por alimentos são: *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*, *Vibrio* sp, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Samonella* spp, *Shiguella* spp, *Campylobacter* spp, *Yersina* spp, *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas* spp e *Plesiomonas shigelloides*.

### 3.5.1.1 Coliformes Termotolerantes e *Escherichia coli*

Infecções causadas por coliformes são complexas e envolvem múltiplos modos de transmissão. Alguns gêneros como *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* e *Serratia*, vivem na água, no solo e também constituem a flora intestinal do homem, assim como a de outros animais endotérmicos, sendo caracterizados como coliformes totais (KONEMAN *et al.*, 2001).

Segundo a ANVISA (2006), coliformes totais são bacilos gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, oxidase-negativos que fermentam a lactose com produção de ácido e gás a 35 °C, em 24-48 horas, possuem a enzima  $\beta$ -galactosidase. Os coliformes totais são comumente encontrados nas fezes de animais endotérmicos, material vegetal e no solo, por isso a *E. coli* é a mais utilizada como indicador direto de contaminação por fezes, pois sua presença está intimamente ligada à presença de contaminação fecal (BURBARELLI, 2004).

Coliformes termotolerantes, são bactérias do grupo coliforme que apresentam as características do grupo, porém à temperatura de incubação de 44,5 °C  $\pm$ 0,2 por 24 horas (ANVISA, 2006). Coliformes fecais constituem um subgrupo dos coliformes totais, cujo habitat natural é o trato intestinal dos animais endotérmicos. Do ponto de vista sanitário, funcionam como indicadores capazes de evidenciar uma maior probabilidade de que o alimento tenha entrado em contato com material de origem fecal, caracterizados ainda pela sua capacidade de fermentarem a lactose com produção de ácido e gás à temperatura de 44,5°C (JORDANO *et al.*, 1995).

Amplamente distribuídos na natureza se propagam com maior frequência na água. Os coliformes fecais que têm tido grande atenção da saúde pública, por estarem associados a um elevado número de patologias isoladas em laboratórios de microbiologia clínica e virtualmente suspeitos da maioria das infecções intestinais humanas conhecidas. Além de infecções intestinais, organismos coliformes, podem estar envolvidos em diversas outras patologias, como meningites, intoxicações alimentares, infecções urinárias e pneumonias nosocomiais (KONEMAN *et al.*, 2001).

### 3.5.1.2 *Salmonella* spp

As bactérias do gênero *Salmonella* são bastonetes Gram-negativos anaeróbicos facultativos e não formadores de esporos, pertencentes à família Enterobacteriaceae. Seu habitat normal é o trato intestinal dos seres humanos e de muitos animais (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Atualmente, *Salmonella* é um dos micro-organismos mais frequentemente envolvidos em casos de surtos de doenças alimentares em diversos países, incluindo o Brasil (FRANCO; LANDGRAF, 2005). A sua patogenicidade varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro. As doenças causadas costumam ser divididas em febre tifóide, febre entérica e enterocolite ou salmonelose (BALIONI; FERNANDES; SOARES, 2003).

As infecções humanas produzidas por salmonelas em geral ocorrem por ingestão de alimentos, água ou leite contaminados por fezes humanas ou de animais. As salmonelas são primariamente patógenos de animais (aves domésticas, suínos, pássaros, ovinos), os quais são as principais fontes de salmonelose não-tifóide em humanos (KONEMAN *et al.*, 2001).

### 3.5.1.3 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família Micrococcaceae e por se dividirem-se em planos diferentes, quando vistos ao microscópio aparecem na forma de cacho de uva. São anaeróbias facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando, então, produzem a enzima catalase (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Os estafilococos são resistentes aos estresses ambientais e possuem uma resistência alta ao calor; as células vegetativas podem tolerar 60°C por meia hora. Sua resistência ao ressecamento e a radiação auxilia-os a sobreviver nas superfícies cutâneas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

O homem e os animais são os principais reservatórios de *S. aureus*. Esta bactéria habita com frequência a nasofaringe do ser humano, a partir da

qual pode facilmente contaminar as mãos do homem e penetrar no alimento, causando a intoxicação alimentar estafilocócica (MURRAY *et al.*, 2000). Se os micro-organismos são deixados incubar no alimento, uma situação denominada abuso de temperatura, reproduzem-se e liberam enterotoxinas no alimento (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Uma das principais causas de gastroenterite é a intoxicação alimentar estafilocócica, uma intoxicação produzida por *Staphylococcus aureus* (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). A intoxicação alimentar causada por este microrganismo é devido à contaminação de alimentos pelas exotoxinas (enterotoxinas) produzidas pela bactéria. Estas são termoestáveis e podem permanecer no alimento mesmo após o cozimento. Dentre as intoxicações alimentares de origem bacteriana, cerca de 45% destas no mundo estão relacionadas com esta bactéria (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A transmissão ocorre quando, ingere um alimento contendo a enterotoxina estafilocócica. Alimentos manipulados por pessoas portadoras do patógeno em secreções nasofaríngeas ou com ferimentos nas mãos, abscessos ou acnes; ou produtos de origem animal contaminados, que não foram cozidos ou refrigerados adequadamente, permanecendo em temperatura ambiente por determinado tempo que permita a multiplicação do organismo e a produção da enterotoxina termoestável. Superfícies e equipamentos contaminados podem ser também a causa de intoxicações (FERREIRA, 2006).

A intoxicação geralmente tem início abrupto e violento, com náusea, vômitos e cólicas, prostração, pressão baixa e temperatura subnormal. Alterações na frequência cardíaca podem também ser observadas. A recuperação ocorre em torno de dois dias, porém, alguns casos podem levar mais tempo ou exigir hospitalização. A morte é rara, contudo, pode ocorrer em crianças, idosos e indivíduos debilitados. O diagnóstico é fácil, especialmente quando há um grupo de casos, com predominância de sintomas gastrintestinais superiores e com intervalo curto entre o início dos sintomas e ingestão de um alimento comum (FERREIRA, 2006).

### 3.5.2 Fungos

Os fungos são micro-organismos eucariontes heterotróficos que obtêm sua energia pela ruptura de moléculas orgânicas, podendo ocupar diversos nichos ecológicos, atuando como parasitas, sapróbios ou então estabelecendo relações simbióticas, por exemplo, com algas, formando os líquens (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Os fungos apresentam grande diversidade e são amplamente difundidos em diferentes ambientes. Possuem grande importância na decomposição de material vegetal de origem terrestre que cai na água, influenciando de maneira decisiva no transporte de materiais entre o meio terrestre e o meio aquático. (ROCHA, 2003). Fungos tem a habilidade de crescer atacando o substrato, formando parte da microbiota de biofilmes em superfícies e detritos (PATERSON; GONÇALVES; LIMA, 2006).

A ausência e/ou processo de sanitização ineficiente pode promover a formação de biofilmes que são agregados microbianos que abrigam bactérias, fungos filamentosos e leveduras e podem estar presentes em equipamentos, utensílios e nos meios de transporte requeridos para colheita e pós-colheita de frutos (BEUCHAT, 1997).

A microflora responsável pela deterioração dos produtos prontos para o consumo inclui um grande número de fungos, leveduras e bactérias. A carga microbiana dos produtos minimamente processados é também influenciada pelos mesmos fatores externos: temperatura de transporte, armazenamento e comercialização. Na maioria das vezes essa biota de patógenos é composta por fungos, principalmente *Penicillium* sp, *Sclerotinia* sp, *Botrytis* sp e *Rhizopus* sp (ALBIERI, 2005).

A contaminação e a deterioração dos alimentos causadas por fungos são mais comuns que as originadas por qualquer outro grupo de microrganismos. A contaminação por fungos é importante não apenas sob o ponto de vista sensorial, mas também pelo perigo que a produção de micotoxinas representa para o consumidor (MUNINBAZI; BULLERMAN, 1996).

Somente nos últimos 30 anos tornou-se claro que o desenvolvimento de fungos filamentosos em alimentos pode resultar na produção de toxinas,



conhecidas como micotoxinas, as quais são definidas como metabólitos secundários, ou seja, não apresentam nenhuma função no metabolismo normal que envolve o desenvolvimento dos fungos. São compostos de baixo peso molecular, produzidos no final da fase log de crescimento e que provocam resposta tóxica em vertebrados e outros animais quando ingeridos em baixa concentração (PITT, 2000).

Fungos filamentosos se desenvolvem naturalmente em frutas, sementes, cereais e subprodutos que são muito utilizados na alimentação humana e animal. Uma vez ingerido o alimento com a toxina, esta causa diversos efeitos deletérios à saúde, induzindo diferentes sinais clínicos e lesões. Os tipos de sinais clínicos e lesões são intimamente relacionados a cada micotoxina, dose ingerida, período de intoxicação e espécie animal envolvida (DILKIN; MALLMANN, 2004).

A identificação das espécies de fungos contaminantes é importante sinalizador da presença de micotoxinas nos substratos e pode ser utilizado como método preventivo (FARIAS et al., 2000). Entretanto, Ranjan e Sinha (1991) afirmaram que o isolamento e a identificação desses fungos nem sempre estão ligados à detecção de micotoxinas no produto analisado, considerando que existem cepas dentro de uma mesma espécie que não possuem a capacidade de produção de metabólitos tóxicos.

A presença de fungos em água potável e biofilmes de sistemas aquáticos têm recebido uma atenção limitada. Isso se deve em parte, ao fato da relação entre fungos e qualidade de água ainda ser incerta. Entretanto, doenças relacionadas a fungos aquáticos estão associadas a problemas de odor e sabor, contaminação de alimentos e bebidas, e uma variedade de sintomas relatados (DOGGET, 2000).

Alguns estudos regionais no Brasil correlacionam a distribuição de fungos a gradientes de poluição seja em ambientes marinhos, ou em sistemas de água doce. Muitas espécies de leveduras são utilizadas como eficientes indicadoras de poluição da água (ROCHA, 2003).

Espécies de *Penicillium* são frequentemente isoladas de águas em vários estudos realizados. Muitas dessas espécies em ambos os gêneros

*Penicillium* e *Aspergillus* são conhecidas por produzir micotoxinas em outros substratos, como alimentos e bebidas. (PITT; HOCKING, 1999).

Micotoxinas e outros metabólitos podem ser produzidos por fungos aquáticos. Micotoxinas produzidas na água naturalmente estarão muito diluídas, e provavelmente serão a menor preocupação. Entretanto, água é ocasionalmente armazenada em cisternas e reservatórios, ou até mesmo em garrafas, por longos períodos. Nesses casos, as concentrações de micotoxinas podem aumentar se o fungo estiver presente na água. (PATERSON, GONÇALVES; LIMA, 2006).

### 3.6 PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS (PIF) – OPÇÃO PARA UM FRUTO MAIS SEGURO

O mercado internacional, diante das novas exigências do consumidor, impõe a necessidade de produção de bens de alta qualidade. Programas de qualidade na cadeia de produção têm sido adotados em diversos ramos produtivos, principalmente em mercados de produtos perecíveis, incluindo o de frutas que tem forte aceitação a nível internacional (GUEDES, 2007).

A Produção Integrada é apontada como uma alternativa para a produção de frutas de qualidade, pois utiliza práticas de manejo do solo e da planta de forma integrada, procurando equacionar os problemas através de uma visão multidisciplinar e não na aplicação de práticas isoladas, como ocorre na fruticultura convencional (FACHINELLO *et al.*, 2001).

Segundo a Organização Internacional para Controle Biológico e Integrado contra os Animais e Plantas Nocivas (OILB) a Produção Integrada é definida como o sistema de produção que gera alimentos e demais produtos de alta qualidade, mediante a aplicação de recursos naturais e regulação de mecanismos para a substituição de insumos poluentes e a garantia da sustentabilidade da produção agrícola. Enfatiza o enfoque do sistema holístico, envolvendo a totalidade ambiental como unidade básica; o papel central do agro ecossistema; o equilíbrio do ciclo de nutrientes; a preservação e o desenvolvimento da fertilidade do solo e a diversidade ambiental como componentes essenciais; métodos e técnicas biológicos e químicos,

cuidadosamente equilibrado, levando-se em conta a proteção ambiental, o retorno econômico e os requisitos sociais.

Os produtores que adotaram a Produção Integrada de Frutas, possuem o selo de certificação como garantia de qualidade e adequação aos padrões estipulados, traduzindo-se no passaporte à entrada no mercado internacional, não sendo necessária a adoção de programas internacionais de certificação (GUEDES, 2007).

Os princípios básicos que regem a PIF estão amparados na elaboração e desenvolvimento de normas e orientações de comum acordo entre os agentes de pesquisa, ensino e desenvolvimento; extensão rural e assistência técnica; associação de produtores; base produtiva; autoridades do país, por meio de um processo multidisciplinar, objetivando com isso, assegurar que a fruta produzida esteja em consonância com um sistema que garanta que todos os procedimentos realizados estão em conformidade com a sistemática definida pelo Modelo de Avaliação da conformidade adotada (ANDRIGUETO; KOSOSKI, 2005).

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

As coletas foram realizadas em duas propriedades participantes do projeto de Produção Integrada do Morango (PIMO), situadas na cidade de São José dos Pinhais, no estado do Paraná, nas safras do ano de 2008 e 2009. Na primeira propriedade foi coletada a água de irrigação e na segunda além dessa, foram coletadas amostras do fruto, da caixa de coleta e da microbiota das mãos de produtores

A água de irrigação foi coletada diretamente do rio Moinho e seu afluente segundo as especificações de BRASIL (2003).

A análise da microbiota das mãos e da caixa de coleta dos frutos foi realizada através da técnica do *swab* de contato, conforme especificações da APHA (2001) e como solução estéril para a coleta foi utilizada salina peptonada 0,1% (item 4.2.2).

Antes da coleta a cabeça do *swab* esterilizado foi umedecida em solução salina peptonada 0,1% e posteriormente pressionada contra a parede do tubo para retirar o excesso de solução. Depois de finalizada a coleta, a haste do *swab* foi cortada com uma tesoura esterilizada e depositada no frasco que continha a solução salina peptonada 0,1%.

A remoção da microbiota das mãos deu-se com movimentos circulares a partir dos punhos, pela superfície da palma, bordas e dedos. Para a caixa de coleta o *swab* foi passado com movimentos lentos e firmes em uma área de aproximadamente 50 cm<sup>2</sup> por três vezes, mudando a direção em cada ciclo, tocando a superfície num ângulo de 30°.

Para a coleta do fruto foi feita uma simulação de colheita, onde o produtor colheu o fruto, processou e o embalou.

As amostras foram encaminhadas e analisadas no Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LabMicro), no Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

## 4.2. PREPARO DAS AMOSTRAS

### 4.2.1. Fruto

O procedimento utilizado para o preparo da amostra foi o descrito por BRASIL (2003). Antes do preparo da amostra, foi realizada a assepsia da embalagem com algodão embebido em etanol 70% (item 4.2.1).

Com auxílio de pinça e bisturi esterilizados, foram cortados e pesados 25g do fruto adicionados 225 mL de solução salina peptonada 0,1% e homogeneizados sob agitação em câmara incubadora com agitação orbital (Shaker), 70rpm por 5 minutos.

### 4.2.2. Microbiota das Mãos e Utensílios

Os frascos de solução salina peptonada 0,1% foram incubados a 35°C durante 24 horas para posterior análise.

## 4.3. MEIOS DE CULTURA E SOLUÇÕES

### 4.3.1. Etanol 70%

Etanol Absoluto .....	300 mL
Água destilada .....	1000 mL

### 4.3.2. Solução Salina Peptonada 0,1%

Cloreto de sódio .....	8,5 g
Peptona .....	1,0 g
Água destilada .....	1000 mL

A solução foi esterilizada em autoclave a 121°C a por 20 minutos.

#### 4.3.3. Ácido Tartárico 10%

Ácido Tartárico.....	10,0 g
Água destilada .....	90,0 mL

Os componentes foram misturados, sendo então esterilizados por filtração.

#### 4.3.4. Lactofenol de Amann (CRUZ, 1981)

Ácido lático .....	10,0g
Ácido fênico .....	10,0g
Glicerina.....	20,0g
Água destilada .....	10,0 mL

#### 4.3.5. Ágar Estoque

Peptona bacteriológica.....	13,8 g
Extrato de levedura .....	6,0 g
Extrato de carne.....	12,2 g
Cloreto de sódio.....	10,0 g
Fosfato de sódio bibasico.....	2,0 g
Agar .....	15,0 g

Os componentes foram misturados, sendo então esterilizados em autoclave a 121°C a por 20 minutos.

#### 4.3.6. Água peptonada

Cloreto de sódio.....	5,0g
Peptona .....	15,0g
Água destilada .....	1000 mL

Todos os compostos foram misturados, sendo então esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos.

#### 4.3.7. Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose (BPLS)

Peptona de carne.....	5,0 g
Peptona de caseína .....	5,0 g
Extrato de levedura .....	3,0 g
Lactose .....	10,0 g
Sacarose.....	10,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Fosfato de sódio bibásico.....	2,0 g
Verde brilhante.....	0, 0125 g
Vermelho de fenol .....	0,08 g
Agar .....	12,0 g
Água destilada .....	1000 mL

Os compostos foram misturados, sendo esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Antes do uso, após esterilização do meio e resfriamento até cerca de 50°C, foi adicionado a cada 100 mL de meio 0,1 mL de solução de novobiocina a 4%.

#### 4.3.8. Caldo Uréia

Extrato de levedura .....	0,1 g
Fosfato de potássio monobásico.....	9,1 g
Fosfato de sódio bibásico.....	9,5 g
Uréia .....	20,0 g
Vermelho de fenol .....	0,1 g

Os componentes, exceto a uréia, foram misturados e esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos. Posteriormente foi adicionada a uréia e o meio foi utilizado em seguida.

#### 4.4. ISOLAMENTO DOS FUNGOS

##### 4.4.1. Água

Foi inoculado 0,1 mL da amostra sobre a superfície seca do meio Ágar Sabouraud (Himedia) adicionado de tetraciclina (160µL para cada 400 mL de meio), com 5 placas para cada amostra. Com auxílio de alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado por toda superfície do meio, até sua completa absorção. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 7 dias. (adaptado de HAGESKAL, LIMA; SKAAR, 2009).

##### 4.4.2. Fruto

Com auxílio de pinça e bisturi esterilizados, foram cortados e pesados 25g do fruto adicionados 225 mL de solução salina peptonada 0,1% (item 4.2.2.) e homogeneizados sob agitação em câmara incubadora com agitação orbital (Shaker), 70rpm a 25°C por 5 minutos.

Foi inoculado 0,1mL da diluição  $10^{-1}$  sobre a superfície seca do meio BDA (Himedia) acidificado com ácido tartárico 10% (item 4.2.3.) - (1,5 mL para cada 100 mL de meio), com 5 placas para cada diluição. Com auxílio de alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado por toda superfície do meio, até sua completa absorção. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 7 dias BRASIL (2003).

##### 4.4.3. Mãos e Utensílios

A partir da amostra inicial foram realizadas três diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) em tubos de 0,9 mL de solução salina peptonada 0,1% (item 4.2.2.) e, de cada



uma delas, foi inoculado 0,1mL sobre a superfície seca do meio BDA (Himedia) acidificado com ácido tartárico 10% (item 4.2.3.) - (1,5 mL para cada 100 mL de meio), com 5 placas para cada diluição. Com auxílio de alça de Drigalski, o inóculo foi espalhado por toda superfície do meio, até sua completa absorção. As placas foram incubadas em estufa a 28°C por 7 dias.

Para o isolamento dos fungos da água, do fruto, das mãos e utensílios as colônias foram repicadas em tubos de ensaio com meio de cultura BDA (Himedia) inclinado, incubados em estufa a 28°C de 3 a 5 dias e agrupados de acordo com sua morfologia colonial para posterior identificação.

#### 4.4.4. Identificação dos isolados

Os isolados foram identificados pela técnica do microcultivo (KERN; BLEVINS, 1999). Observando as lâminas de 7 e de 14 dias. A identificação foi realizada através de observações de corpos de frutificação ao microscópio óptico e da utilização de literatura especializada (KLICH; PITT, 1988; BARNETT; HUNTER, 1987; LARONE, 1987; HAZEN; GORDON; REED, 1973; MENEZES; OLIVEIRA, 1993; KERN, 1988; HERRERA; ULLOA, 1990; HOOG; GUARRO, 2004).

##### 4.4.4.1. Técnica do microcultivo (KERN e BLEVINS, 1999)

Foram utilizadas placas de Petri esterilizadas, contendo em seu interior uma lâmina e um pedaço de algodão. Sobre a lâmina foi colocada um cubo de meio de cultura BDA (Himedia) de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> e, em suas arestas, foi repicado o fungo isolado a ser identificado. Sobre o cubo então, foi colocada uma lamínula esterilizada e o pedaço de algodão foi umedecido com água destilada esterilizada.

A placa foi incubada em estufa a 28°C durante 7 e 14 dias. Após o período de incubação, a lamínula foi retirada e colocada sobre uma lâmina com uma gota de Lactofenol de Amann (item 4.2.4.). O excesso do lactofenol foi retirado com o auxílio de um papel absorvente, e as bordas da lamínula foram vedadas com esmalte incolor.

#### 4.5. ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

##### 4.5.1. Água e fruto

Para análise da água e do fruto a prova presuntiva foi feita a partir da inoculação de volumes de 10 mL da diluição  $10^{-1}$  da amostra coletada em uma série de três tubos contendo Caldo Lauril Sulfato (Himedia) em concentração dupla. Em seguida, foram inoculados volumes de 1 mL e 0,1 mL em uma série de 3 tubos contendo Caldo Lauril Sulfato (Himedia) em concentração simples. Os tubos foram incubados em câmara incubadora com agitação orbital (Shaker), 70rpm a 35°C por 48 horas.

Os tubos que se apresentaram positivos, ou seja, com formação de gás nos tubos de Durhan, foram contabilizados e inoculados em Caldo Verde Bile Brilhante (Merck) para a prova confirmativa de coliformes totais. Os tubos foram incubados em em câmara incubadora com agitação orbital (Shaker), 70 RPM a 35°C por 48 horas.

Os tubos que apresentaram formação de gás no tubos de Durhan em Caldo Verde Bile Brilhante (Merck) foram considerados positivos, contabilizados e repicados em Caldo EC (Merck). O material foi incubado em câmara incubadora com agitação orbital (Shaker), 70 RPM a 45°C por 24 horas.

Os tubos com formação de gás foram contabilizados e a partir da combinação de números correspondentes aos tubos que apresentaram resultado positivo em cada um dos testes confirmativos (coliformes totais e coliformes termotolerantes), foi verificado o Número Mais Provável de acordo com BRASIL (2003) e o resultado foi expresso em NMP  $\text{mL}^{-1}$  para água e NMP  $\text{g}^{-1}$  para fruto.

#### 4.6. DETECÇÃO DE *Escherichia coli*

##### 4.6.1. Água, fruto, mãos e utensílios

Para a detecção de *Escherichia coli* na água a partir dos tubos positivos do Caldo EC, foi retirada uma alçada de inóculo com a alça de platina e estriada em com meio Ágar Eosina Azul de Metileno (Himedia), com 5 placas para cada amostra. Para análise das mãos e utensílios a partir da amostra inicial foram realizadas três diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) em tubos de 0,9 mL de Solução Salina Peptonada 0,1% (item 4.2.2.) e, de cada uma delas, foi retirada uma alçada de inóculo com a alça de platina e estriada em placas com meio Ágar Eosina Azul de Metileno (Himedia), com 3 placas para cada diluição. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas.

As colônias típicas de *E. coli* em EMB são nucleadas com centro preto, com ou sem brilho metálico. Havendo colônias típicas estas foram selecionadas e repicadas em Ágar Estoque (item 4.3.5.), sendo incubadas em estufa a 35°C por 24 horas para posteriores provas bioquímicas.

#### 4.6.2 Provas Bioquímicas para *Escherichia coli*

Para confirmação de *E. coli* foram utilizadas as provas do Indol, Citrato, VM-VP (IMViC). A partir do Ágar Estoque (item 4.3.5.), foram inoculadas alçadas em Água Peptonada para prova do Indol (item 4.3.6), meio Koser Citrato (Himedia) para prova do citrato e meio Clark Lubs (Himedia) para prova do VM-VP, e os meios foram incubados em estufa a 35°C por 24 horas.

A prova do Indol determina a capacidade do micro-organismo degradar o aminoácido triptofano até indol. Após a incubação do meio, adiciona-se o Reativo de Erlich ao longo da parede do tubo, as culturas que apresentarem a formação de um anel avermelhado na superfície são indol positivo. *E. coli* é indol positivo.

A prova do Citrato diferencia micro-organismos pela capacidade de usar o citrato como única fonte de carbono. *E. coli* é citrato negativo, portanto, o meio não apresenta crescimento.

A prova de Voges-Proskauer (VP) determina a capacidade dos micro-organismos produzirem produtos finais não ácidos ou neutros, como o acetilmetilcarbinol, a partir dos ácidos orgânicos que resultam da metabolização da glicose. Após a incubação adiciona-se ao meio solução 40%

KOH e solução de  $\alpha$ -naftol para detectar acetilmetilcarbinol. O desenvolvimento de uma coloração avermelhada indica teste positivo, *E. coli* é VP negativa.

A prova do Vermelho de Metila determina a capacidade dos micro-organismos para oxidar a glicose com produção e manutenção de concentrações altas de produtos finais ácidos. Após a incubação, adiciona-se vermelho de metila ao meio, o desenvolvimento de uma coloração avermelhada indica prova positiva. *E. coli* é VM positiva.

#### 4.7. DETECÇÃO DE *Salmonella* spp.

##### 4.7.1. Fruto, Mãos e Utensílios

O procedimento utilizado para detecção de *Salmonella* spp foi o descrito por BRASIL (2003).

Foi feito o enriquecimento seletivo pipetando-se 0,2 mL da diluição  $10^{-1}$  em tubos contendo 10 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (Merk) e 10 mL Caldo Selenito Cistina (Merk) respectivamente, incubando o material em estufa a 40°C por 24 a 30 horas.

Após o período de incubação, foi feito o isolamento em meio Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol Lactose Sacarose - BPLS (item 4.3.7.) e Ágar XLD (Himedia), em 3 placas para cada meio. A partir dos caldos era retirada uma alçada de inóculo com a alça de platina. As placas foram incubadas a 36°C por 24 horas.

As colônias típicas de *Salmonella* sp em BPLS são rosas ou vermelhas claras, opacas, rodeadas por zonas vermelhas brilhantes. Em XLD são cor de rosa escuro, com ou sem centro preto.

As colônias suspeitas foram selecionadas e posteriormente submetidas a provas bioquímicas em Caldo Uréia (item 4.2.8.), Ágar Tríplice Açúcar Ferro (Himedia) e Ágar Lisina e Ferro (Himedia) com incubação a 35°C por 24 horas.

A prova da Urease evidencia a presença da enzima urease, que hidrolisa a uréia alterando a cor inicial do meio. *Salmonella* não produz urease.

No ágar TSI, estão presentes: glicose, lactose e sacarose. Como a glicose é um monossacarídeo e está em baixa concentração, será rapidamente fermentada anaerobiamente, formando ácido no fundo do tubo, o que torna o meio amarelo pela viragem do indicador vermelho de fenol. A grande maioria das salmonelas não fermenta a sacarose e a lactose, não provocando alterações no meio TSI. Como a fonte de carbono utilizável (glicose) é rapidamente esgotada, a *Salmonella* passa a degradar aerobiamente o substrato protéico do meio, produzindo  $\text{NH}_3$ , o que confere ao meio um pH alcalino, modificando a coloração do bisel para rosa intenso (BRASIL, 2003).

A maioria das salmonelas apresenta no TSI as seguintes reações: Ácido na base, com ou sem produção de gás, alcalino ou inalterado no bisel, com produção de  $\text{H}_2\text{S}$ .

O Ágar LIA detecta a presença da lisina descarboxilase, evidenciada pela não alteração do meio após incubação. A maioria das salmonelas é capaz de produzir lisina descarboxilase.

#### 4.8. DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus*

##### 4.8.1. Mãos e utensílios

O procedimento utilizado para detecção de *Staphylococcus aureus* foi o descrito por BRASIL (2003).

A partir da amostra inicial foram realizadas três diluições (10-1, 10-2, 10-3) em tubos de 0,9 mL de Solução Salina Peptonada 0,1% (item 4.2.2.) e, de cada uma delas, foi retirada uma alçada de inóculo com a alça de platina e estriada em placas com meio Ágar Manitol Sal (Himedia), com 3 placas para cada diluição. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas.

As colônias típicas *Staphylococcus aureus* nesse meio são amarelas. Havendo colônias típicas, estas foram selecionadas e repicadas em Ágar Estoque (item 4.3.5.) e incubadas em estufa a 35°C por 24 horas para a realização da prova da coagulase, da catalase e coloração de gram.

Por possuir a enzima coagulase, o *S. aureus* é capaz de coagular o plasma de coelho. Com auxílio da alça de platina, uma alíquota do cultivo do ágar estoque foi transferido para uma lâmina contendo uma gota de plasma de coelho liofilizado. A formação de coágulos indica coagulase positiva.

A prova da catalase baseia-se no fato do *S. aureus* possuir a enzima catalase, que decompõe o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio, o que é evidenciado por meio da formação de borbulhas. Com auxílio da alça de platina, uma alíquota do cultivo do ágar estoque foi transferido para uma lâmina contendo uma gota de peróxido de hidrogênio. A formação de borbulhas indica catalase positiva.

Na coloração de Gram, a presença de cocos Gram positivos caracteriza *S. aureus*.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ISOLAMENTO DOS FUNGOS

#### 5.1.1. Água

Os isolados fúngicos obtidos a partir da água de irrigação coletadas nas duas propriedades foram classificados em dois gêneros: *Drechslera* sp e *Scopulariopsis* sp (FIGURAS 7 e 10).

Esse resultado difere dos encontrados por HAGESKAL; LIMA; SKAAR (2006) e DOGGET (2000), que observaram uma maior ocorrência de *Penicillium* e *Aspergillus* em águas de rios. Isso pode ter ocorrido devido a diferenças de metodologia, já que esses autores utilizaram o método da membrana filtrante.

*Drechslera* é um fitopatógeno, comumente encontrado vegetais. Várias espécies desse gênero estão relacionadas a doenças em vegetais. O fungo *Drechslera oryzae* é o agente causal da Mancha Parda, a qual é uma doença comum no Brasil em lavouras de arroz (PRABHU; FILIPPI; RIBEIRO, 1999).

Segundo Przybysz e Scolin (2009), *Scopulariopsis* é um fungo filamentoso que habita solo, material vegetal, penas, e insetos. É distribuído em todo o mundo e é normalmente considerado como contaminante, que pode provocar infecções em seres humanos, especialmente em pacientes imunossuprimidos. *Scopulariopsis* spp. pode causar várias infecções em seres humanos. Ela está entre os fungos que causam onicomicose especialmente nas unhas do pé.

Não existem relatos sobre os efeitos desses fungos sobre a qualidade do morango, mas a presença destes fitopatógenos na produção deve ser investigada, de forma a assegurar se são inofensivos ou não para o fruto. Porém, deve-se salientar que o produtor ao entrar em contato com a água de irrigação, pode contaminar-se com *Scopulariopsis* spp, que é um agente causador de micoses.

### 5.1.2. Mãos e utensílios

Os isolados fúngicos obtidos a partir das mãos foram classificados em três gêneros: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acremonium* (FIGURAS 3, 5, 4 e 8) já na caixa de coleta além dos dois primeiros foram encontrados os gêneros *Cladosporium* e *Rhizopus* (FIGURAS 6 e 9).

Foram identificados dois morfotipos de *Aspergillus*, de acordo com diferenças nas características macroscópicas e microscópicas.

Segundo Michereff; Domingos; Menezes(2005), os fungos mais encontrados nos solos pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Phytophthora*, *Pythium*, *Plasmodiophora*, *Rhizopus*, *Sclerotium*, *Scopulariopsis*, *Thielaviopsis* e *Trichoderma*. Assim, os isolados encontrados neste trabalho podem ter sido provenientes do solo, que contaminaram as mãos e a caixa de coleta durante a colheita do fruto.

Muitos dos gêneros identificados, são fitopatógenos ou produzem micotoxinas. Várias espécies de *Penicillium* estão envolvidas em processos degradativos de frutas, como *P. expansum* e *P. digitatum* (FRANCO; LANDGRAF, 2003). *Rhizopus* são bolores comuns na deteriorização de alimentos de origem vegetal, com produção de enzimas pecnolíticas (FRANCO; LANDGRAF, 2003). Não existem relatos sobre a ação de *Acremonium* e *Cladosporium* sobre o morango, porém, estudos mais aprofundados devem ser realizados para verificar o efeito destes sobre a qualidade e segurança alimentar.

### 5.1.3. Fruto

Os isolados fúngicos obtidos a partir do fruto foram classificados em dois gêneros: *Aspergillus* sp e *Penicillium* sp (FIGURAS 4,5 e 8 - APÊNDICE).



Os resultados mostram que esses gêneros também estavam presentes nas mãos e na caixa de coleta, o que indica que, pode ter ocorrido contaminação cruzada.

Algumas espécies de *Aspergillus* sp são importantes agentes de deteriorização de alimentos, como *A. glaucus* e *A. repens*. Outras, como *A. flavus* e *A. parasiticus*, são produtores de micotoxinas (aflatoxinas, ocratoxina A e esterigmatocistina) (FRANCO; LANDGRAF, 2003). A aflatoxina é uma micotoxina cujos riscos para os seres humanos ainda é desconhecido, porém existem fortes evidências de que ela contribui para a cirrose hepática e o câncer de fígado (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Mais de 20 gêneros de fungos estão envolvidos na deterioração de frutas, como *Alternaria*, *Botrytis*, *Penicillium* e *Phytophthora*, sendo alguns generalizados em várias frutas e outros específicos para determinado tipo de fruta. Em geral, as frutas são mais susceptíveis ao crescimento de fungos ao se tornarem mais maduras ou desidratadas (BRACKETT, 1997).

As características de deteriorização dependem do tipo de produto atacado e dos micro-organismos envolvidos no processo. O micélio do bolor pode ser visível, apresentando esporos coloridos, ou estar sob a superfície, quando então aparecem apenas pontos deteriorados (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A presença de fungos em número elevado é indesejável, quanto à qualidade microbiológica, porque são capazes de produzir grande variedades de enzimas, que provocam a deterioração de frutos. Além disso, muitos bolores podem produzir metabólicos tóxicos quando estão se desenvolvendo nos alimentos (REIS *et al.*, 2008).

## 5.2. ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E TERMOTOLERANTES

### 5.2.1. Água

Segundo o CONAMA, Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, as águas para irrigação de plantas com frutos consumidos crus não deve ter mais de 1000 coliformes totais por 100 mL de amostra. Os coliformes fecais não podem ultrapassar 200 coliformes fecais por mL de amostra.

Todas as amostras analisadas apresentaram valores superiores de 200 coliformes fecais por mL de amostra, logo foram consideradas impróprias para a irrigação.

TABELA 1 – NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES PRESENTES NAS AMOSTRAS DE ÁGUA UTILIZADAS PARA A IRRIGAÇÃO NAS PROPRIEDADES LOCALIZADAS EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS -PR (SAFRA 2008 E 2009)

Amostra	NMP/mL	Balneabilidade
<b>SAFRA 2008</b>		
Propriedade 1	>1600/100 mL	Imprópria
Propriedade 2	>1600/100 mL	Imprópria
<b>SAFRA 2009</b>		
Propriedade 1	>1600/100 mL	Imprópria
Propriedade 2	>1600/100 mL	Imprópria

Fonte: O autor

O número elevado de coliformes indica a possibilidade da contaminação por patógenos, fezes humanas ou de animais endotérmicos (BURBARELLI,

2004). Os resultados obtidos (Tabela 1) mostraram que não houve variação na qualidade da água da safra 2008 e 2009, fato que pode indicar que a balneabilidade desta pode estar relacionada com a presença constante de animais endotérmicos próximos a fontes de água.

Trata-se de um parâmetro importante, pois culturas irrigadas com água contendo organismos patogênicos conferem riscos à saúde humana quando esses produtos são consumidos crus ou quando do contato direto do irrigante com esta água contaminada (DOTTO, 1993).

Segundo BURBARELLI (2004), uma das mais perigosas formas de contaminação da água, disseminando doenças, ocorre quando micro-organismos presentes em fezes humanas ou de animais penetram no sistema de abastecimento de água, devido a falhas no processo de tratamento, ou por possíveis fontes de contaminação no sistema de distribuição. As propriedades não possuem qualquer tipo de cerca ou barreira que limite o acesso de animais as fontes de água, que podem defecar nas proximidades e, inclusive, diretamente nas fontes de água, contaminando-as.

Outro fator que influencia a qualidade microbiológica da água é o escoamento superficial, durante o período de chuva. Em períodos chuvosos, fezes depositadas próximas às fontes podem ser carregadas e contaminar a água. Segundo AMARAL *et al.* (2003). A presença de coliformes nas amostras de água de mananciais, tem relação direta com a presença de chuva, devido ao arraste de excretas humanas e animais. Se for constatada a contaminação por coliformes fecais na água, pode-se supor a presença de organismos patogênicos, que causam doenças como febre tifóide, febres entéricas e ainda infecções generalizadas com acesso à corrente sanguínea e a urina. Alguns organismos patogênicos podem infectar o homem a partir das fezes de outros animais, sendo de suma importância que este fator seja considerado como uma barreira sanitária específica (PAGANINI, 1997).

#### 5.2.2. Fruto

Segundo a ANVISA, Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, morangos frescos e similares, "in natura", inteiros, selecionadas ou não devem ter mais de  $2 \times 10^{-3}$  NMP/g de coliformes termotolerantes.

TABELA 2 – NÚMERO MAIS PROVÁVEL DE COLIFORMES TOTAIS PRESENTES NAS AMOSTRAS Dos FRUTOS DO MORANGO COLETADOS NAS PROPRIEDADES LOCALIZADAS EM SÃO JOSÉ DOS PINHAIS -PR (SAFRA 2009)

<b>Amostra</b>	<b>NMP g<sup>-1</sup></b>
Propriedade 1	>1600NMP g <sup>-1</sup>
Propriedade 2	Ausência

Fonte: O autor

Em uma das amostras (Propriedade 1) não foi detectada a presença de coliformes totais e termotolerantes nos frutos, estando de acordo com a resolução vigente. A outra amostra apresentou um número elevado de coliformes totais (>1600NMP g<sup>-1</sup>), mas não apresentou coliformes termotolerantes. Segundo Franco e Landgraf (2005), coliformes totais além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em vegetais e solo. Consequentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal recente ou ocorrência de enteropatógenos. Isso pode justificar o fato de não haver legislação vigente que determine o número máximo de coliformes totais em alimentos. Dessa forma os frutos analisados estão de acordo com a legislação.

Porém deve-se ressaltar que a água de irrigação apresenta-se imprópria para o uso, podendo ser fonte de contaminação cruzada. A presença de coliformes fecais nessa indica que os frutos tiveram contato direto e/ou indireto com coliformes termotolerantes que, encontrando as condições necessárias para seu crescimento podem multiplicar-se neste (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

### 5.3. DETECÇÃO DE *Escherichia coli*

#### 5.3.1. Água

Foi detectada a presença de *Escherichia coli* (FIGURA 2 – APÊNDICE) em todas as amostras de água analisadas. Esse resultado confirma os resultados obtidos na análise de coliformes totais e termotolerantes, de que a água analisada é imprópria para a irrigação.

*E. coli* é indicador de contaminação fecal do trato intestinal de animais endotérmicos, onde contém um grande número de bactérias que são eliminadas com as fezes. A presença das bactérias do grupo dos coliformes na água de um rio significa que esse rio recebeu matérias fecais ou esgotos (DEBERDT, 2003).

É necessário que sejam tomadas medidas para diminuir o nível de contaminação, porém, segundo MATTOS (2003), o tratamento de água para fins de irrigação é um processo dispendioso que não é comumente utilizado por agricultores. Uma alternativa seria restringir o acesso de animais aos locais próximos à fonte de água, para evitar que ocorra contaminação através das fezes.

O controle analítico e o monitoramento da água tratada devem ser realizados com rigor, com frequência e em pontos específicos de amostragem, pois muitos fatores contribuem para comprometer as propriedades da água, representados pela carga poluidora variável que pode ser maior ou menor dependendo do regime das chuvas, problemas na distribuição e falhas imprevisíveis que podem prejudicar o tratamento da água ou promover nova contaminação em várias etapas do abastecimento ou estocagem prévia ao consumo (ALVES, 2007). A coleta da safra 2009 foi realizada em um período de chuvas intensas e frequentes, o que pode ter influenciado a ocorrência de *E. coli*, provavelmente proveniente do arraste de excretas depositadas próximas à fonte.

Cabe ressaltar, especial cuidado com os trabalhadores, residentes e visitantes, em não utilizarem águas residuárias para beber, portanto, o

suprimento de água potável é uma medida indispensável para o controle de exposição (MATTOS, 2003).

### 5.3.2. Mãos e utensílios

Foi detectada a presença de *E. coli* nas amostras das mãos dos produtores das duas propriedades analisadas. Isso pode ser resultado de vários fatores, sendo o principal a higiene pessoal inadequada. Manipuladores com higiene pessoal inadequada podem causar a contaminação do alimento e das superfícies de manipulação. Fatores que levam a este tipo de contaminação são: higienização inadequada das mãos, falar, tossir e espirrar sobre o alimento (FONSECA *et al*, 2006).

Como a água de irrigação analisada está contaminada, pode ter ocorrido contaminação cruzada. Ao colher o fruto, o produtor entrou em contato com a água, que pode ter contaminado suas mãos. A manipulação é uma importante forma de contaminação de alimentos, pois hábitos higiênicos inadequados, como a falta de regularidade na lavagem das mãos, permitem que micro-organismos causadores de doenças sejam disseminados (SOUZA *et al.*, 2001).

Se o produtor não lavar as mãos corretamente, a bactéria ficará em sua pele, apresentando um risco à segurança do fruto e até mesmo a sua própria saúde. Segundo SILVA *et al* (2005), portadores assintomáticos de doenças, incluindo-se as enteroparasitoses, podem contaminar, por meio das mãos, os alimentos por eles manipulados.

Em relação à caixa de coleta, não foi detectada a presença de *Escherichia coli*, o que pode confirmar o fato da contaminação das mãos ter sido proveniente da água de irrigação ou da má higiene pessoal.

Estudos têm demonstrado que inúmeros surtos alimentares têm sido freqüentemente associados à precária higiene pessoal dos manipuladores. De fato, eles exercem uma função importante na segurança alimentar por poderem introduzir patógenos nos alimentos durante a produção, processamento, distribuição e o preparo. A presença de microrganismo patogênico nas mãos representa grande importância epidemiológica, devido à possibilidade de transferência cruzada para os alimentos (NAVARRO, 2000).

### 5.3.3. Fruto

As amostras do fruto não apresentaram a presença de *E. coli*, estando de acordo com a resolução vigente (Resolução nº 12, de 2 de janeiro de 2001 da ANVISA). Isso não significa que o fruto esteja livre da possibilidade de contaminação, visto que esse patógeno foi detectado em outras etapas da produção como água de irrigação e mãos dos produtores que manipulam o fruto.

### 5.4. DETECÇÃO DE *Salmonella* spp.

Em nenhuma das amostras de mãos, utensílios ou fruto foi detectada a presença de *Salmonella* spp.

Segundo a ANVISA, Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, o padrão estabelecido para o fruto é ausência em 25g de fruto. Os resultados encontrados estão de acordo com o estabelecido pela resolução. Não existe legislação específica que defina os limites máximos de presença de *Salmonella* spp em mãos e utensílios utilizados durante o processamento de alimentos. Porém, dado que o fruto não pode apresentar qualquer traço do micro-organismo, espera-se que este não seja encontrado nas etapas de produção, para que não haja o risco de ocorrer contaminação cruzada.

### 5.5. DETECÇÃO DE *Staphylococcus aureus*

Em todas as amostras analisadas, foi detectada a presença de *Staphylococcus aureus* (FIGURA 1 – APÊNDICE). Segundo Franco e Landgraf (2003), *S. aureus* é encontrado em lesões de pele e nas vias aéreas superiores do homem, sendo transferidos facilmente para os alimentos. Se o produtor ao manipular o produto for portador da bactéria e não tiver uma postura adequada em relação à higiene pessoal, pode transferi-la para as mãos, utensílios e consequentemente contaminar o fruto.

O manuseio sob condições inadequadas de higiene durante o processamento, associado ao aumento dos danos aos tecidos e a higienização insatisfatória dos equipamentos, contribui para a elevação da população microbiana em vegetais. Tal fato aumenta o risco da presença de patógenos e de microrganismos deterioradores nesses produtos (FANTUZZI; PUSCHMANN; VANETTI, 2004).

A qualidade da matéria-prima alimentar, as condições do ambiente de trabalho, as características do equipamento e dos utensílios e as condições técnicas do material de limpeza têm sua importância, mas nada suplanta a importância de manipulação e a própria saúde dos manipuladores na epidemiologia das doenças transmitidas pelos alimentos (MEYER; MOREIRA; PIAZETTA, 2005).

Os resultados obtidos indicam que não está sendo realizada a higienização adequada das caixas de coleta dos frutos e, segundo FONSECA *et al.* (2006), os equipamentos utilizados para o processamento podem ser potenciais fontes de contaminação do vegetal, pois apresentam partes de difícil higienização, onde as bactérias ficam alojadas. As instalações, utensílios e os equipamentos que não forem limpos adequadamente permitirão a permanência de bactérias e fungos que podem entrar em contato com o alimento, vindo a tornar-se um problema grave.

## 5.6. PROPOSTAS PARA MINIMIZAÇÃO DA CARGA MICROBIANA

Segundo SILVA (2002), para evitar que ocorram contaminações, deve-se realizar a higienização adequada, deixando o ambiente de manipulação hostil ao ataque de micro-organismos patogênicos, pois eles estão presentes em todos os lugares, incluindo no próprio ser humano.

Para tanto se faz necessária a utilização de medidas preventivas durante as etapas de produção do morangueiro, de modo a diminuir as chances de contaminação do fruto. Segundo SANTOS (2003), o uso de sanificantes visa



reduzir, até níveis seguros, os micro-organismos alteradores de alimentos e eliminar patógenos das superfícies de equipamentos e utensílios que entram em contato com os alimentos e, assim, contribuem para a melhor qualidade microbiológica dos alimentos produzidos.

Porém, como os frutos de morango são consumidos na sua integridade, tanto para consumo natural ou semi processado (polpa), deve-se utilizar na sua conservação produtos totalmente naturais e biodegradáveis, os quais não alterem sabor, cor e aroma característico da fruta (HENRIQUE; CEREDA, 1999).

Estudos realizados por ANDRADE *et al* (2007), demonstraram a eficácia do álcool gel 70% frente a bactérias hospitalares como: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp.e *Pseudomonas aeruginosa*. As formulações à base de gel têm o propósito de reduzir o efeito do álcool em causar ressecamento da pele, mas, em alguns estudos, quando comparadas com formulações líquidas, têm apresentado menor eficácia antimicrobiana (KAWAGOE, 2004). O produto na forma líquida, também apresenta a vantagem de ser mais barato e ser mais fácil de aplicar em grandes superfícies, como mesa e bancadas.

Porém não se deve descartar a limpeza de utensílios e mãos com água e sabão, antes da utilização do álcool 70%. Segundo ANDRADE *et al* (2007), o produto pode tornar-se inativo na presença de sujeira e matéria orgânica.

Os agricultores e os trabalhadores rurais que manejam o cultivo devem adotar as seguintes medidas preventivas: usar roupa protetora; cumprir estritamente as práticas de higiene, vacinar-se contra determinadas infecções e fazer uso de medicamentos como medida paliativa provisória, para evitar a infecção. Outras medidas de proteção à saúde incluem a instalação de postos médicos para tratar as enfermidades diarréicas, o acompanhamento médico regular para tratar as infecções por nematóides e o controle das anemias (MATTOS, 2003).

Para que o manipulador se conscientize da importância de se ter hábitos de higiene, tanto pessoal quanto com os alimentos, é necessária a promoção de programas de treinamentos periódicos de orientação específicos ao

manipulador. O treinamento visa conscientizar os funcionários quanto às noções de higiene, técnicas corretas de manipulação de alimentos e práticas que garantam a inocuidade das refeições, com vista a evitar as toxinfecções alimentares (SOUZA; GERMANO; GERMANO, 2001).

É importante que os produtores de morango realizem um monitoramento contínuo da lavoura, pois isto facilita a detecção precoce de qualquer anormalidade no morangueiro, e consequentemente, as medidas de controle da doença poderão ser aplicadas adequadamente e com maior eficiência (UENO, 2004).

A segurança alimentar desde o pomar até o consumidor, é responsabilidade de todos os agentes da cadeia produtiva. Baseado nestas considerações torna-se necessária a adoção de medidas sanitárias preventivas, durante o processo produtivo, que permitam minimizar os riscos de contaminação microbiana (TIBOLA; FACHINELLO, 2004).

## 6. CONCLUSÕES

- A água utilizada para a irrigação do fruto está fora dos padrões estabelecidos pela legislação, com elevado número de coliformes termotolerantes e presença de *Escherichia coli*.
- Foi detectada a presença de *Escherichia coli* nas mãos dos produtores e *Staphylococcus aureus* nas mãos e caixa de coleta.
- Os gêneros encontrados no isolamento fúngico foram: *Cladosporium* e *Drechslera* na água de irrigação; *Acremonium* na caixa de coleta; *Rhizopus* e *Cladosporium* nas mãos e *Aspergillus* e *Penicillium* na caixa de coleta, nas mãos e no fruto.
- Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram encontrados em todas as etapas da produção, com exceção da água.
- Os resultados positivos para as análises em todas as etapas da produção, o que mostram a necessidade urgente do estabelecimento normas de boas práticas nas propriedades. Propõe-se que animais devem ser mantidos longe das fontes de água e da área de produção, o local de trabalho e caixa de coleta devem sempre estar limpos e higienizados, assim como o produtor, que deve zelar pela higiene pessoal e sempre lavar as mãos, utilizando etanol 70% para desinfetar mãos e utensílios utilizados no morangueiro.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, R. C. C.; KUAYE, A. Y.; SERRANO, A. M.; ALMEIDA, P. F. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v.29, n.4, p. 290-294, 1995.

ALBIERI, S.M.M.J. Elaboração de material didático sobre minimamente processados: contribuição para o curso técnico em agropecuária orgânica. Dissertação (Mestrado em Educação Agrícola) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2005.

ALVES, M.G. **Bactérias na água de abastecimento da cidade de Piracicaba**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.

ANDRADE, D.; BERALDO, C.C.; WATANABE, E.; OLIVEIRA, B.A.; ITO, I. Y. Atividade antimicrobiana in vitro do álcool gel a 70% frente às bactérias hospitalares e da comunidade. **Medicina**, Ribeirão Preto, v.40, n.2, 2007.

ANDRADE, J.N.; MACEDO, B.A.J. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo, Varela, 1996.

AMARAL, L.A.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O.D.; FERREIRA, F.L.A.; BARROS, L.S.S. Água de consumo humano como fator de risco à saúde em propriedades rurais. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v.37, n.4, p.510-514, 2003.

ANVISA. **Resolução - RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001**. Alterada pela **Resolução RDC nº 171, de 04 de setembro de 2006**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12\\_01rdc.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm). Acesso em: 12/10/2009.

BALIONI, G. A; FERNANDES F. V.; SOARES, M. M. S. R.; RIBEIRO, M. C. Avaliação higiênico-sanitária de alfaces agro-ecológicas e cultivadas com agrotóxico, comercializadas na região de Campinas. **Revista Higiene Alimentar**. Itapetininga, v. 17, n. 112, p.74, 2003.

BARNETT, H. C.; HUNTER, B. B. Illustrated genera of imperfect fungi. 3 ed. Minneapolis: **Burgess Publications**, 1987.

BETTEGA, J.M.P.R.; MACHADOLL, M.R; PRESIBELLA, M.; BANISKI, G.; BARBOSA, C.A. Métodos analíticos no controle microbiológico da água para consumo humano. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**.Campinas, v. 30, n. 5, oct/2006.

BEUCHAT, L.R.; RYU, J. H. Produce Handling and Processing Practices. **Emerging Infectious diseases**. Atlanta, v.3, n. 4, 1997.

BRACKETT, R.E. Alteración microbiológicas y microorganismo patógenos de frutas y hortalizas refrigeradas mínimamente procesadas. In: WILEY, R.C. Frutas y hortalizas mínimamente procesadas y refrigeradas. Zaragoza: **Acribia**, p. 263-304, 1997.

BRASIL. Instrução Normativa n. 62 de agosto de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 de setembro de 2003. Seção 1, p.14.

BRASIL. **Cartilha sobre Boas Práticas para Serviços de Alimentação**. ANVISA, Brasília, 2004. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/public/alimentos/cartilha\\_gicra\\_final.pdf](http://www.anvisa.gov.br/DIVULGA/public/alimentos/cartilha_gicra_final.pdf). Acesso em: 02/10/2009.

BRASIL. **Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Ministério da saúde**. Disponível em [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual\\_dta.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_dta.pdf). Acesso em: 18/11/2009.

BURBARELLI, R.C. **Avaliação da qualidade da água subterrânea e microbiologia do solo em área irrigada com efluente de lagoa anaeróbia**. Dissertação (Mestrado em Concentração em Saneamento e Ambiente) – UNICAMP, Campinas, 2004.

CONAMA. **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 23/06/2009.

DEBERDT, J. A. **Análise da água**. Programa pró ciência. Disponível em: [www.educar.sc.usp.br/biologia](http://www.educar.sc.usp.br/biologia). Acesso em 05 de novembro de 2009.

DILKIN, P. & MALLMANN C.A. Sinais clínicos e lesões causadas por micotoxina. In: **Encontro Nacional de Micotoxinas**, 11, 2004, Piracicaba. Anais e Palestras... Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

DOTTO, S.E. **Índice de qualidade de água para culturas irrigadas**. Dissertação (Mestrado em Recursos hídricos e Saneamento) – UNICAMP, Campinas, 1993.

EMBRAPA. **Sistema de Produção de Morango**. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Morango/SistemaProducaoMorango/cap15.htm>. Acesso em: 4/02/2009.

FACHINELLO, J.C.; GRUTZMACHER, A.D.; FARIA, J.L.; HERTER, F.G.; FORTES, J.F.; AFONSO, A.P.S.; TIBOLA, C.S. Avaliação agrônômica de um pomar de pessegueiro conduzido no sistema de produção integrada. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, SP, v. 23, n.1, p.138-142, 2001.

FANTUZZI, E.; PUSCHMANN, R.; VANETTI, M.C.D. Microbiota contaminante em repolho minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 24, n. 2, jun/2004.

FARIAS, A.X. F.; ROBBS, C.F.; BITTENCOURT, A.M.; ANDERSEN, P.M.; CORREA, T.B.S. Contaminação endógena por *Aspergillus* spp. em milho pós-colheita no Estado do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. Brasília, v.35, n.3, p.617-621, 2000.

FERLA, N.J.; MARCHETTI, M.M.; GONÇALVES, D. Ácaros predadores (Acari) associados à cultura do morango (*Fragaria* sp, Rosaceae) e plantas próximas no Estado do Rio Grande do Sul. **Biota Neotropica**. São Paulo, v.7, n.2, 2007.

FERREIRA, S.M.S. **Contaminação de alimentos ocasionada por manipuladores**. Monografia – Curso de Pós-graduação *Lato sensu*. Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos**. Atheneu, 2005.

FONSECA, M.J.O.; OLIVEIRA, A.G.M.; SOARES, A.G. **Preparo de Frutas e Hortaliças Minimamente Processadas em Bancos de Alimentos**. EMBRAPA, 2006. Disponível em: [www.mds.gov.br/...alimentar.../banco-de-alimentos/...bancos-de-alimentos/...alimentar.../banco-de-alimentos/](http://www.mds.gov.br/...alimentar.../banco-de-alimentos/...bancos-de-alimentos/...alimentar.../banco-de-alimentos/). Acesso em: 12/08/2009.

GORNY, J. R. **Food safety guidelines for the fresh-cut produce industry**. Alexandria: International Fresh-cut Produce Association, 2001.

GUEDES, M.S.B.; SENA, M.; TOLEDO, S. Certificação como estratégia competitiva internacional dos produtores de frutas no Brasil. **Encontro da Sociedade Brasileira de Economia Ecológica**, 7, Fortaleza, Anais e palestras... p.2-5, 2007.

HAGESKAL, G.; LIMA, N.; SKAAR, I. The study of fungi in drinking water. **Mycological research**. Amsterdam, v.113, n.2, p. 165-162, 2009.

HAZEN, E. L.; GORDON, M. A.; REED, F. C. **Laboratory identification of pathogenic fungi simplified**. 3 ed. Springfield: Charles C. Thomas, 1973.

HENRIQUE, C.M.; CEREDA, M.P. Utilização de biofilmes na conservação pós-colheita de morango (*Fragaria Ananassa Duch*) cv IAC Campinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.19, n.2, p. 270-276, 1999.

HERRERA, T.; ULLOA, M. **El reino de los hongos: Micología básica y aplicada**. 1 ed. México: Universidad Nacional Autónoma de México: Fondo de Cultura Económica, 1990. p. 552.

HOOG, G. S.; GUARRO, J. **Atlas of Clinical Fungi**. Centraalbureau voor Schimelcultures/Universitat rovíra i Virgili, 2004.

JAY, M.J. **Modern food microbiology: mycotoxins**. New York: Chapman and Hall. p.595-611, 1996.

JORDANO R, LOPEZ C, RODRIGUEZ V, CORDOBA G, MEDINA LM, BARRIOS J. Comparison of Petrifilm method to conventional methods for enumerating aerobic bacteria, coliforms, *Escherichia coli* and yeasts and molds in foods. **Acta Microbiol Immunol Hung** 1995;42:255-9.

JUNIOR, W. M. S.; CARELI, R. T.; ANDRADE, N. J.; MENDONÇA, R. C. S. Qualidade microbiológica de equipamentos, utensílios e manipuladores de uma indústria de processamento de carnes. **Revista Nacional da Carne**. São Paulo, n. 326, p. 36-46, abr/2004

KAWAGOE, J.Y. **Higiene das mãos: comparação da eficácia antimicrobiana do álcool – formulação gel e líquida – nas mãos com matéria orgânica**. Tese (Doutorado). Escola de Enfermagem – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

KAYS, S. J. Preharvest factors affecting appearance. **Postharvest Biology and Technology**. v. 15, p. 233–247. 1999.

KERN, M. E.; BLEVINS, K. S. **Micologia Médica**. São Paulo: Editora Premier, 2ª. ed. 1999.

KLICH, M. A.; PITT, J. I. Common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Austrália: **Commonwealth Scientific and Industrial research Organization**, 1988. p. 116.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. – **Diagnóstico microbiológico**. São Paulo: MEDSI, 2006.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. Washington: ASM Press, 4ª ed. p. 303-304. 2002.

MATTOS, K.M.C. **Viabilidade da irrigação com água contaminada por esgoto doméstico na produção agrícola**. Tese (Doutorado em Irrigação e Drenagem) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita, Botucatu, 2003.

MATTOS, M.L.T. Segurança alimentar: o caso do morango. In: **Simpósio Nacional do Morango**, 2, Pelotas, Anais e palestras... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. p. 162-168.

MATTOS, M.L.T.; SILVA, M.D. Controle da qualidade microbiológica das águas de consumo na microbacia hidrográfica Arroio Passo do Pilão. Comunicado Técnico. **EMBRAPA**, 2002.

MENEZES, M.; OLIVEIRA, S. M. A. **Fungos fitopatogênicos**. Pernambuco: UFRPE, Imprensa Universitária, 1993. p. 227.

MEYER T., MOREIRA A.S., PIAZETTA L.S. Importância da higiene pessoal no manipulador de alimentos. **Estudos de Biologia**. Curitiba, v.27, n.59, 2005.

MICHEREFF, S.J.; DOMINGOS, E.G.T.; MENEZES, M.M. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos**. Recife: Imprensa Universitária.- UFRPE. 2005.

MORAES, I.V.M.; CENCI, S.A.; BENEDETTI, B.C.; MAMEDE, A.M.G.N.; SOARES, A.G.; BARBOZA, H.T.G. Características físicas e químicas de morango processado minimamente e conservado sob refrigeração e atmosfera controlada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v.28, n.2, 2008.

MURRAY, P.R; Rosenthal, K.S; Pfaller, M.A. **Medical Microbiology**, 5ª edição, 2005, Elsevier Mosby, Edimburgo;

MUNINBAZI, C.; BULLERMAN, L. Molds and mycotoxins in foods from Burundi. **J. Food Protect**. Des Moines, v. 59, n. 8, p. 869-875, 1996.

NASCENTE, A.S. A Fruticultura no Brasil. **EMBRAPA Rondônia**. 2003.

NAVARRO, S.H.V.R. **Treinamento para manipuladores de alimentos: enfoque nas técnicas de treinamento exemplificado com a lavagem das mãos**. Tese (Doutorado). São Paulo: Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PAGANINI, W.S. **Disposição de esgotos no solo (escoamento à superfície)**. São Paulo: Fundo Editorial da AESABESP, p.232, 1997.

PATERSON R.; GONÇALVES, A.; LIMA, N. Mycological Examination and Biofilm Formation in Drinking Water. In: **International Mycological Congress**, 8, 2006, p. 129, 2006.

PITT, J. I.; BASÍLICO, J. C.; ABARCA, M. L.; LÓPEZ, C. **Mycotoxins and toxigenic fungi**. Oxford: Medical Mycology, v. 38, p. 41-46, 2000.

PITT J.I.; HOCKING A.D. **Fungi and Food Spoilage**, Gaithersburg : Aspen Publishers. 2ª Ed.1999.

PORTE, A.; MAIA, L.H. Alterações fisiológicas, bioquímicas e microbiológicas de alimentos minimamente processados. **B. CEPPA**. Curitiba, v.19, n.1, p. 105-118, jan/jul. 2001.

PRABHU, A.S., FILIPPI, M.C., RIBEIRO, A.S. 1999. In: **A cultura do arroz do arroz no Brasil**. EMBRAPA, 1999.

PRZYBYSZ, C. H.; SCOLIN, E. Avaliação do formaldeído como fungicida no laboratório de anatomia humana. **Revista F@pciência**. Apucarana, v.5, n. 12, p. 121 – 133, 2009.



RANGARAJAN, A.; BIHN, E.A.; GRAVANI, R.B.; SCOTT, D.L.; PRITTS, M.P. Food safety begins on the farm: a grower's guide. **UC Small Farm Program**. p.8-10. Disponível em: <http://www.sfc.ucdavis.edu/docs/foodsafety.html>. Acesso em: 18/11/2009

RANJAN, K.S; SINHA, A.K. Occurrence of mycotoxigenic fungi and mycotoxins in animal feed from Bihar, India. **Journal of the science of food and agriculture**. Essex, v.56, n.1, p.39-47, 1991.

REIS, C.K.; SIQUEIRA, H.H.; ALVES, P.A.; SILVA, J.D.; LIMA, L.C.O. REIS, K. C. Efeito de diferentes sanificantes sobre a qualidade de morango CV. Oso Grande. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 32, n.1, p.196-202, jan./fev., 2008.

RESENDE, L.M. de A.; MASCARENHAS, M. H. T.; PAIVA, B. M. de. Panorama de Produção e comercialização do Morango. **Informe Agropecuário**. Belo Horizonte, v.20, n.198, p. 5-19, 1999.

ROCHA, O. **Avaliação do estado do conhecimento da diversidade biológica do Brasil – Águas Doces. Versão Preliminar**, Ministério do Meio Ambiente, p. 14-15, 2003.

SANTOS, H. P. **Influência da sanificação sobre a qualidade de melão (Cucumis melo L) minimamente processado**. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SILLOS, M.D.; NETO, U.F. Foodboune – Doenças veiculadas por alimentos – intoxicação alimentar. **The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases**. v. 8, n.3, 2004. Disponível em: < <http://www.e-gastroped.com.br/sept04/intoxica.htm>.> Acesso em: 5/02/2009.

SILVA, A.E. **Manual de Controle Higiênico Sanitário dos alimentos**. São Paulo: Varela. 5ª Ed. 2002.

SILVA, J. O.; CAPUANO, D. M.; TAKAYANAGUI, O. M.; JUNIOR GIACOMETTI, E. Enteroparasitoses e onicomicoses em manipuladores de alimentos do município de Ribeirão Preto. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. São Paulo, v. 8, n. 4, p. 385-392, 2005.

SILVA, P.A. **Qualidade de morangos cultivados na região de Lavras - MG armazenados a temperatura ambiente**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SOARES, G.A.; OLIVEIRA, A.G.M.; FONSECA, M.J.O.; JUNIOR, M.F. Boas práticas de manipulação em bancos de alimentos. **EMBRAPA**. Rio de Janeiro, 32 p, 2006.

SOUTO, R.A. Avaliação Sanitária da Água de Irrigação e de Alfaces (*Lactuca Sativa L.*) Produzidas No Município de Lagoa Seca. Dissertação ( Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal da Paraíba, 2005.

SOUZA, R. R.; GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. Técnica da simulação aplicada ao treinamento de manipuladores de alimentos, como recurso para a segurança alimentar de refeições transportadas. **Revista Higiene Alimentar**. Itapetininga v. 18, n.122, p. 21-24, 2001.

TIBOLA, C.; FACHINELLO, J.C. Tendências e estratégias de mercado para a fruticultura. **Revista Brasileira Agrociência**. Pelotas, n.2, v.10, p. 145-150, 2004.

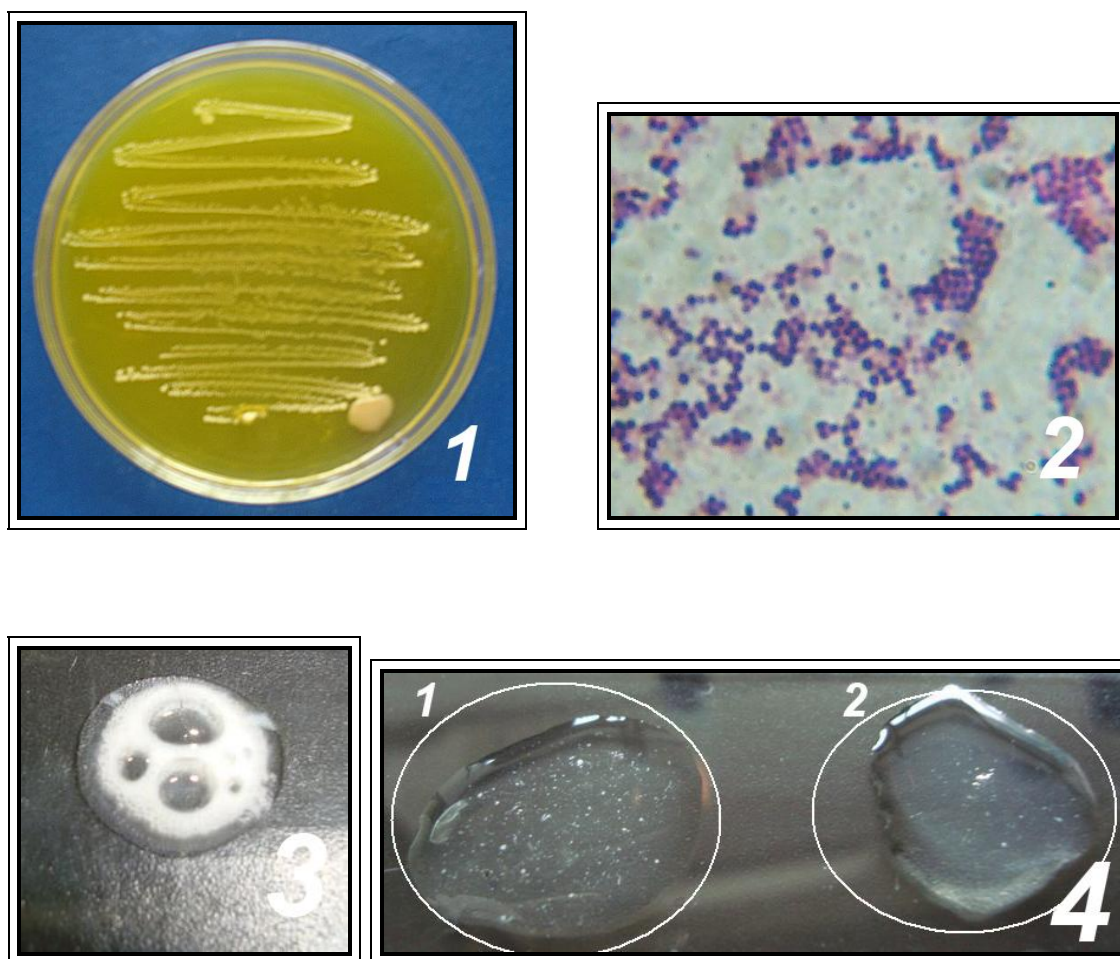
TORREZAN, R.; EIROA, M.N.U.; PFENNING, L. Identificação de micro-organismos isolados em frutas, polpas e ambiente industrial. **B.CEPPA**. Curitiba, v. 18, n. 1, p. 2738, 2000.

TORTORA, G.J., FUNKE, B.R., CASE, C.L., **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed. 6° Ed. 2005.

UENO, B. Manejo integrado de doenças do morango. In: **SIMPÓSIO NACIONAL DO MORANGO**, 2., 2004, Pelotas, Anais e palestras... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, p. 70-76, 2004.

VANETTI, M. C. D. Segurança microbiológica em produtos minimamente processados. In: **Encontro Nacional sobre Processamento Mínimo de Frutas e Hortaliças**, 3, 2004, Viçosa. Palestras... Viçosa: UFV, p. 30-32, 2004.

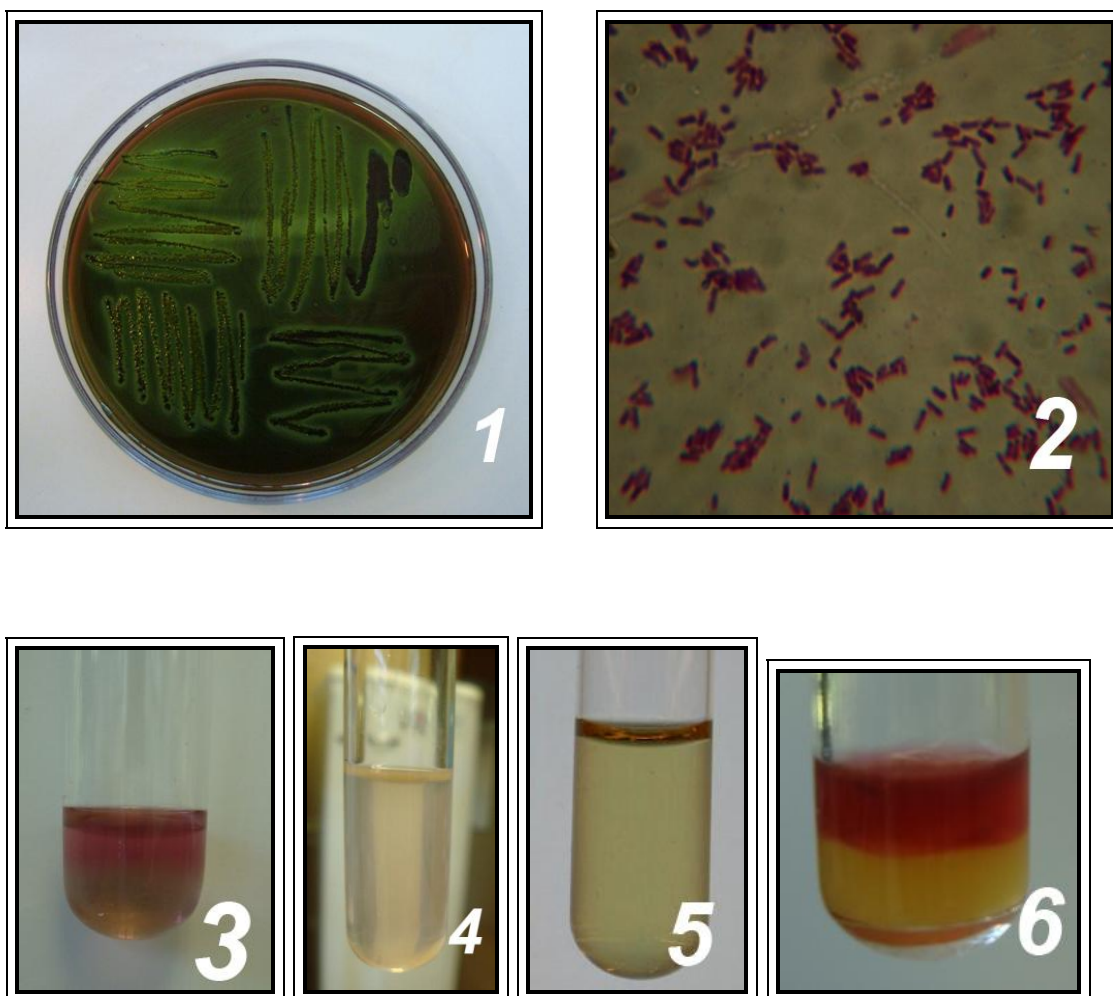
## APÊNDICES



Fonte: O autor

**FIGURA 1 – *Staphylococcus aureus* ISOLADO DE MÃOS E UTENSÍLIOS**

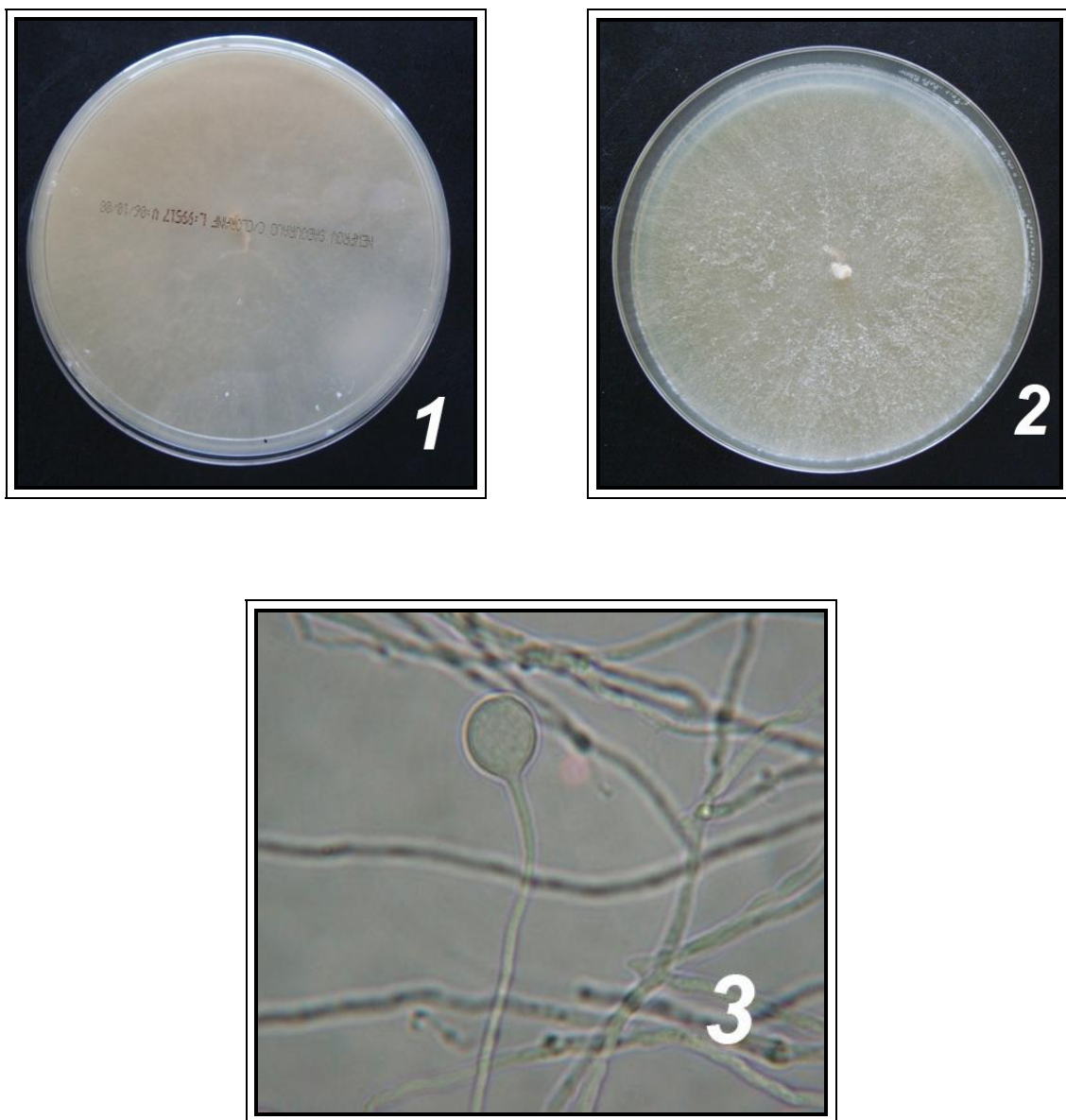
1 – MORFOLOGIA COLONIAL EM MEIO ÁGAR MANITOL SAL (48 HORAS DE CRESCIMENTO) 2 – COLORAÇÃO DE GRAM (AUMENTO DE 1000X) 3- PROVA DA CATALASE POSITIVA 4 - PROVA DA COAGULASE POSITIVA



Fonte: O autor

**FIGURA 2 – *Escherichia coli* ISOLADA DA ÁGUA, MÃOS E UTENSÍLIOS**

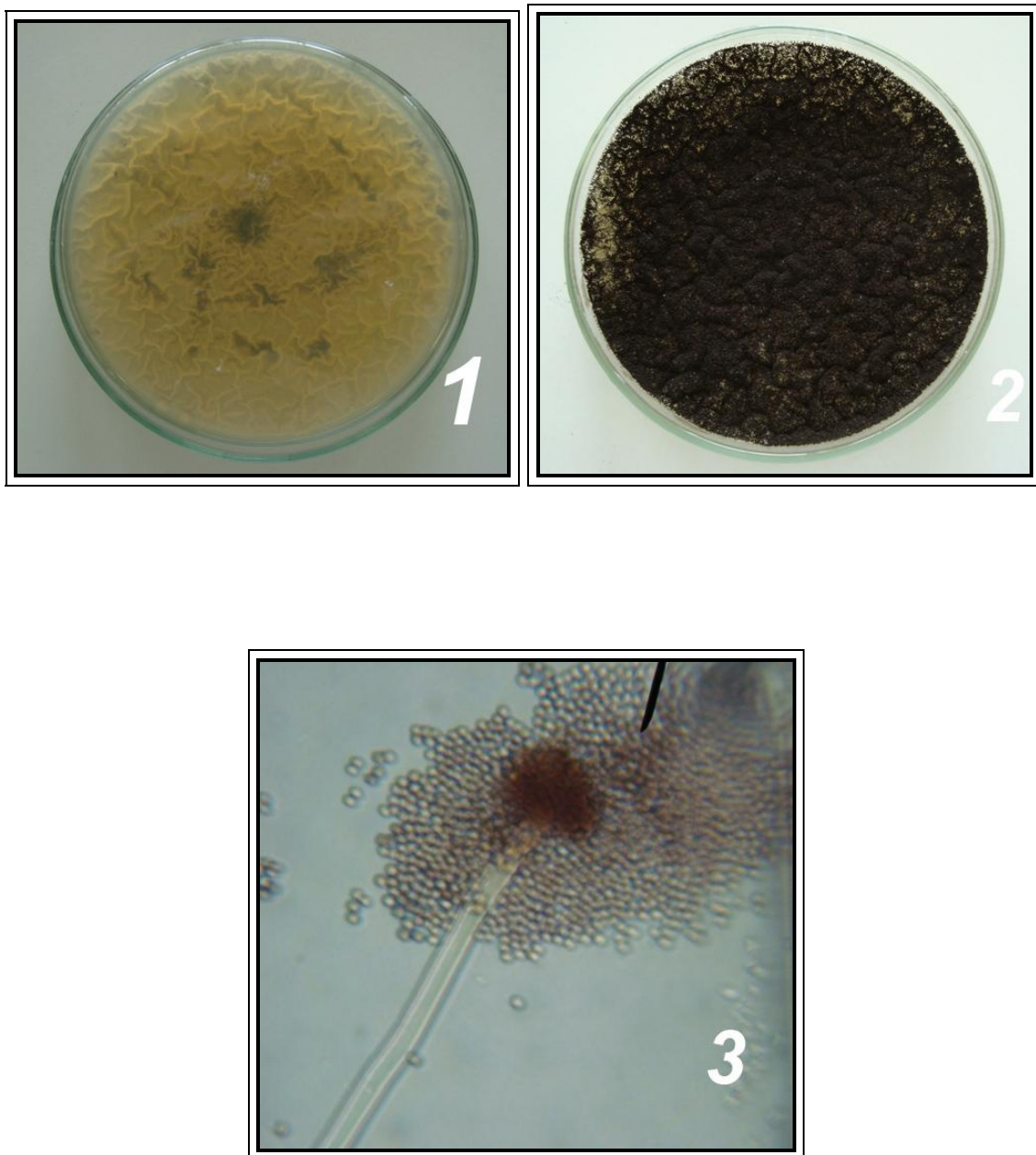
1 – MORFOLOGIA COLONIAL EM MEIO EMB (48 HORAS DE CRESCIMENTO). 2 – COLORAÇÃO DE GRAM (AUMENTO DE 1000X). 3 – PROVA DO INDOL, POSITIVA. 4 – PROVA DO CITRATO, NEGATIVA. 5 – PROVA DO VM, POSITIVA. 6- PROVA DO VP, NEGATIVA.



Fonte: O autor

**FIGURA 3 – *Acremonium* sp ISOLADO DAS MÃOS, CAIXA DE COLETA E FRUTO.**

1 E 2 – MORFOLOGIA COLONIAL (REVERSO E VERSO) EM MEIO BDA, AOS 7 DIAS. 3 – MICROMORFOLOGIA ( AUMENTO DE 400X).AOS 14 DIAS.

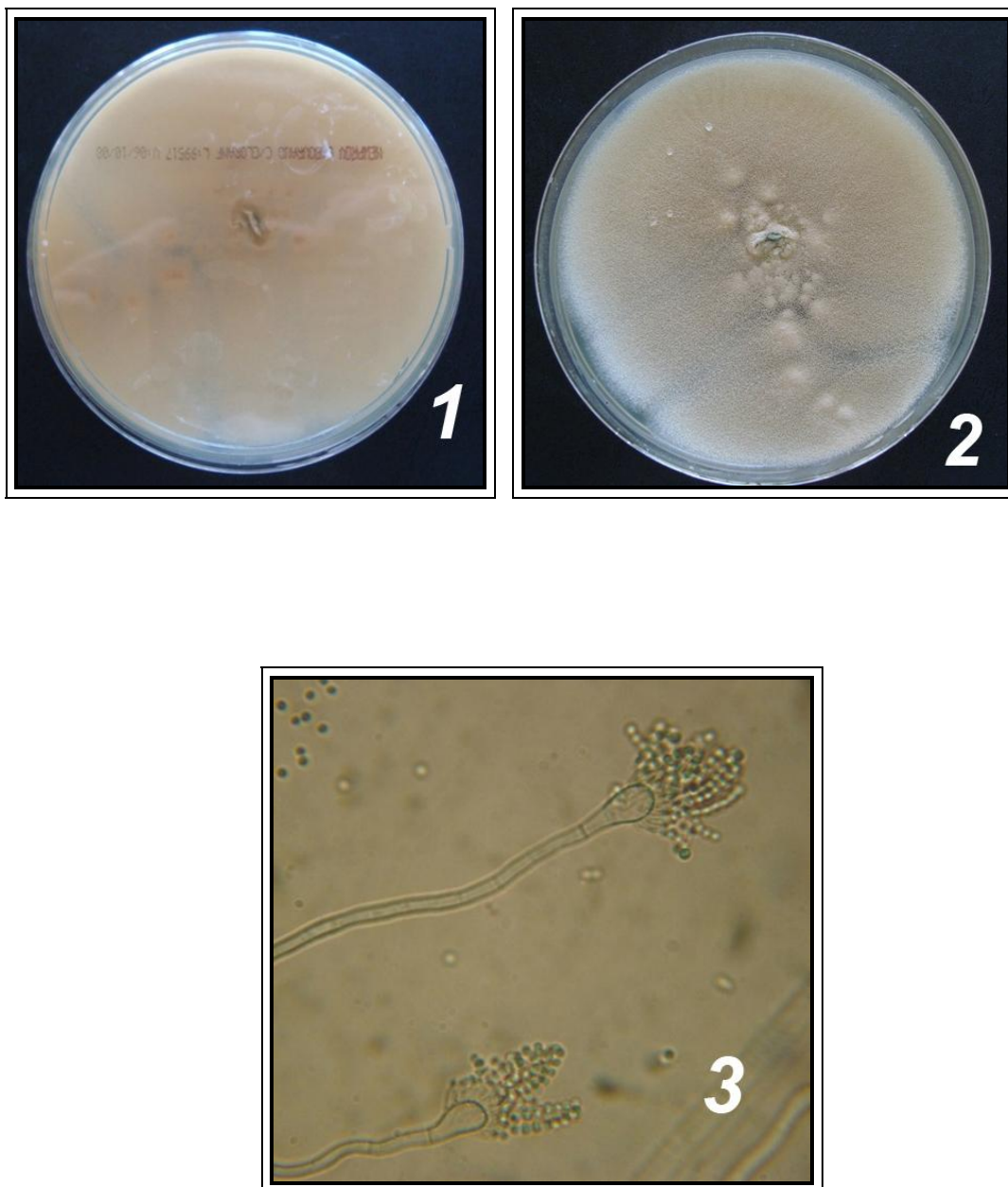


Fonte: O autor

**FIGURA 4 – *Aspergillus* sp1 ISOLADO DAS MÃOS, CAIXA DE COLETA E FRUTO.**

1 E 2 – MORFOLOGIA COLONIAL (REVERSO E VERSO) EM MEIO BDA, AOS 7 DIAS. 3 – MICROMORFOLOGIA ( AUMENTO DE 400X).AOS 14 DIAS.

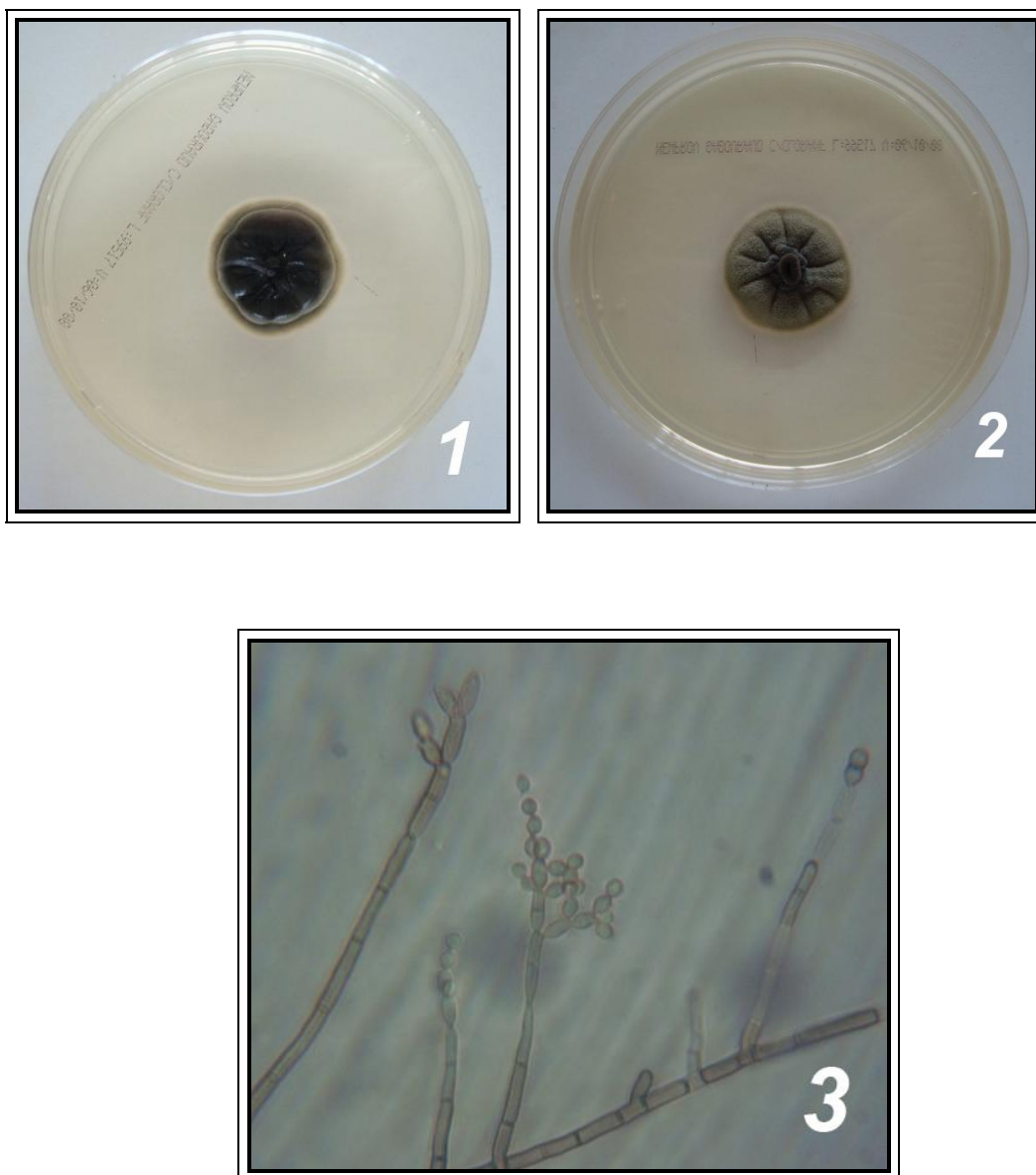




Fonte: O autor

**FIGURA 5 – *Aspergillus* sp2 ISOLADO DA CAIXA DE COLETA E FRUTO**

1 E 2 – MORFOLOGIA COLONIAL (REVERSO E VERSO) EM MEIO BDA, AOS 7 DIAS 3 – MICROMORFOLOGIA ( AUMENTO DE 400X).AOS 14 DIAS.



Fonte: O autor

**FIGURA 6 – *Cladosporium* sp ISOLADO DA CAIXA DE COLETA**

1 E 2 – MORFOLOGIA COLONIAL (REVERSO E VERSO) EM MEIO BDA, AOS 7 DIAS 3 – MICROMORFOLOGIA ( AUMENTO DE 400X).AOS 14 DIAS.

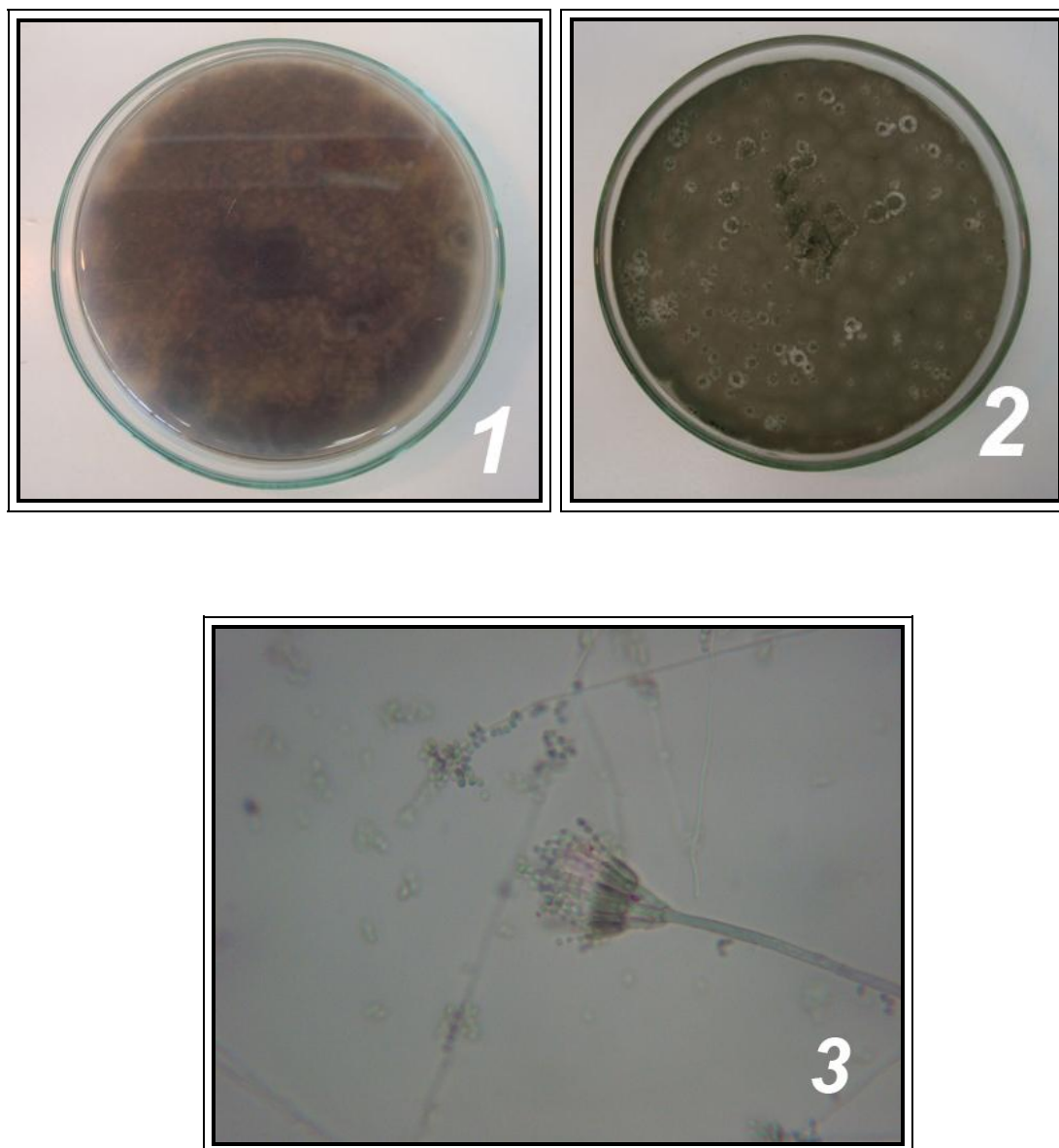




Fonte: O autor

**FIGURA 7 – *Drechslera* sp ISOLADO DA ÁGUA**

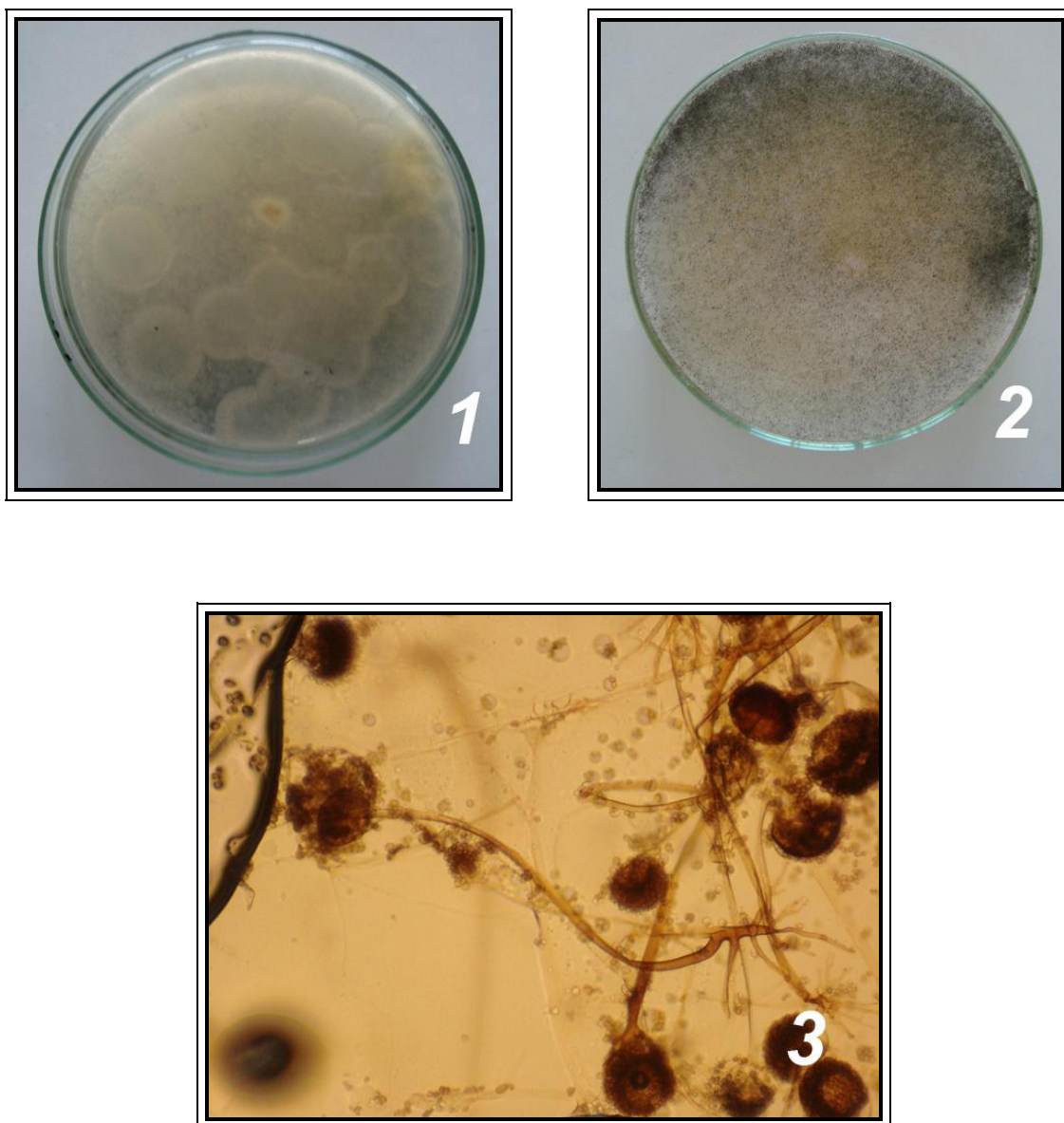
1 – MICROMORFOLOGIA (AUMENTO DE 400X).AOS 14 DIAS.



Fonte: O autor

**FIGURA 8 – *Penicillium* sp ISOLADO DAS MÃOS, CAIXA DE COLETA E FRUTO**

1 E 2 – MORFOLOGIA COLONIAL (REVERSO E VERSO) EM MEIO BDA, AOS 7 DIAS 3 – MICROMORFOLOGIA ( AUMENTO DE 400X).AOS 14 DIAS.



Fonte: O autor

**FIGURA 9 – *Rhizopus* sp ISOLADO DA CAIXA DE COLETA**

1 E 2 – MORFOLOGIA COLONIAL (REVERSO E VERSO) EM MEIO BDA, AOS 7 DIAS 3 – MICROMORFOLOGIA ( AUMENTO DE 400X).AOS 14 DIAS.



Fonte: O autor

**FIGURA 10 – *Scopulariopsis* sp ISOLADO DA ÁGUA**

1 – MICROMORFOLOGIA (AUMENTO DE 400X).AOS 14 DIAS.



# BOAS PRÁTICAS NA PÓS-COLHEITA DO MORANGO

## Sumário

Apresentação .....	3
O que são micro-organismos? .....	4
O que é contaminação? .....	5
Quando os micro-organismos se multiplicam nos alimentos? .....	6
O que são Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)? .....	7
O que são boas práticas? .....	8
Cuidados com a água de irrigação .....	8
Como deve ser o local de trabalho? .....	10
Você lava as mãos corretamente? .....	14
Qual é a postura adequada para o produtor? .....	16

\*Adaptado da Cartilha sobre Boas Práticas na Alimentação (ANVISA)

## Apresentação

O ritmo de vida dos tempos modernos tem elevado a incidência de doenças relacionadas aos maus hábitos alimentares e ao *stress*, como obesidade e doenças cardíacas. Isso tem levado a população a questionar seu cotidiano e, principalmente suas escolhas em relação à alimentação.

Atualmente existe uma preocupação e uma busca por um estilo de vida mais saudável, o que reflete no aumento do consumo de frutas e verduras. Esse aumento do consumo também está ligado a uma mudança de postura, caracterizada por consumidores que procuram não apenas alimentos frescos e saudáveis, mas também, alimentos mais seguros.

A consciência de que o consumo de alimentos *in natura* traz inúmeros benefícios em relação aos industrializados já está consolidada. Porém, o fato de que frutas e vegetais podem ser causadores de doenças é algo que até pouco tempo era subestimado, mas agora está ganhando espaço e influência nas escolhas do cotidiano da população.

O morango é uma fruta que tem grande apelo comercial, com propriedades organolépticas bastante atraentes. É um fruto bastante consumido, sobretudo *in natura*, o que o transforma em um potencial causador de doenças transmitidas por alimentos (DTAS).

A contaminação durante a produção do morango pode dar-se em qualquer momento, visto que micro-organismos fazem parte da natureza e em condições precárias de higiene proliferam-se rapidamente. Desde a qualidade da água utilizada para a irrigação, até a embalagem utilizada para o acondicionamento do produto, todas as etapas do morangueiro são potenciais pontos de contaminação e devem ser monitoradas e avaliadas em relação ao risco microbiológico.



## O que são os micro-organismos?

Os micro-organismos são organismos vivos tão pequenos que só podem ser vistos por meio de um equipamento com potentes lentes de aumento chamado microscópio.

Estão presentes em todos os lugares: na água, no ar, no solo, sob a pele e ferimentos dos homens, nos animais, na área de produção, nos utensílios utilizados na colheita e processamento e no próprio morango.

Alguns micro-organismos são inofensivos, sendo até mesmo úteis para os seres humanos e animais, como é o caso dos micro-organismos utilizados na fabricação de queijos, iogurtes, bebidas e álcool. No entanto, existem aqueles que podem causar não somente alterações nos alimentos (decomposição), mas também a transmissão de doenças e/ou provocar intoxicações alimentares.





## O que é contaminação?

Normalmente, os parasitas, as substâncias tóxicas e os micro-organismos prejudiciais à saúde entram em contato com o fruto durante a colheita e manipulação pelo produtor. Esse processo é conhecido como contaminação. A maioria das DTA está associada à contaminação de alimentos por micro-organismos prejudiciais à saúde. Há mais micróbios em uma mão suja do que pessoas em todo o planeta. Os micro-organismos podem ser divididos nos seguintes grupos: vírus, bactérias e fungos. A maioria das DTA é provocada pelo grupo de micróbios conhecido como bactérias.



Alguns micro-organismos, chamados de deteriorantes, podem estragar o alimento, que fica com cheiro e sabor desagradáveis. Outros micro-organismos, quando presentes nos alimentos, podem causar doenças, sendo chamados de prejudiciais à saúde ou patogênicos. É um grande engano acreditar que os micro-organismos sempre alteram o sabor e cheiro dos alimentos. Alguns micro-organismos multiplicam-se nos alimentos sem modificá-los, ou seja, silenciosamente...

## Quando os micro-organismos se multiplicam nos alimentos?

Os micro-organismos multiplicam-se nos alimentos quando encontram condições ideais de nutrientes, umidade e temperatura.

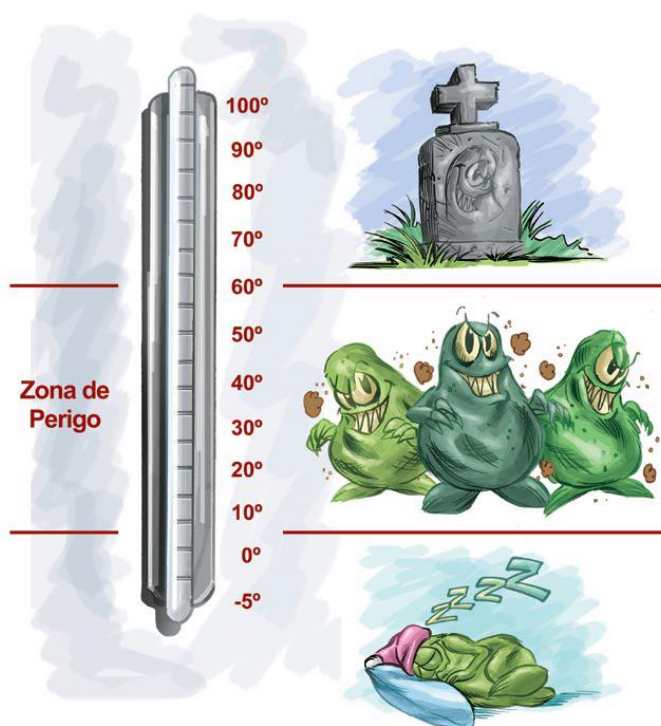
Quando encontram condições ideais, os micróbios se multiplicam- se rapidamente. Para causar doença, é preciso que os micróbios multipliquem-se nos alimentos até atingir números elevados.

Quando as condições do alimento são ideais, uma única bactéria pode se multiplicar em 130.000 em apenas 6 horas.

Os micro-organismos prejudiciais à saúde podem se multiplicar em temperaturas entre 5°C a 60°C (chamada zona de perigo).

Eles preferem temperaturas de verão ou do nosso corpo (em torno de 37°C). Por isso que é importante manter os alimentos perecíveis na geladeira!

A maioria dos alimentos contém umidade suficiente para a multiplicação dos micro-organismos. Esses alimentos devem ser conservados em temperaturas especiais.



## O que são Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)?

São doenças provocadas pelo consumo de alimentos que ocorrem quando micro-organismos prejudiciais à saúde, parasitas ou substâncias tóxicas estão presentes no alimento.

Os sintomas mais comuns de DTA são vômitos e diarreias, podendo também apresentar dores abdominais, dor de cabeça, febre, alteração da visão, olhos inchados, dentre outros. Para adultos saudáveis, a maioria das DTA dura poucos dias e não deixa seqüelas; para as crianças, as grávidas, os idosos e as pessoas doentes, as conseqüências podem ser mais graves, podendo inclusive levar à morte.



**VOMITO**



**DIARREIA**



**MAL ESTAR**



**DOR DE CABEÇA**



**FEBRE**

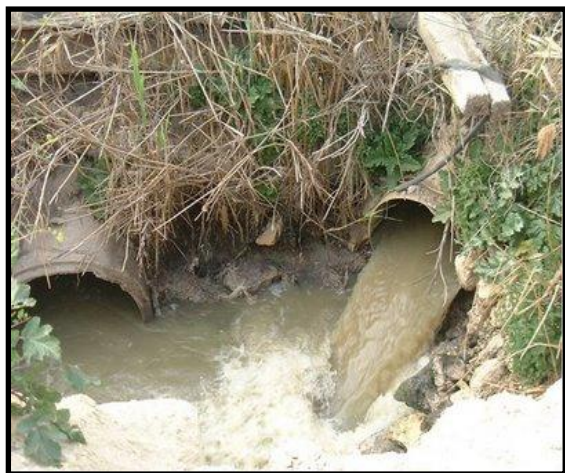
## O que são Boas Práticas?

São práticas de higiene que devem ser obedecidas pelos produtores desde a qualidade da água de irrigação, passando pela triagem e embalagem do produto até a venda para o consumidor. O objetivo das Boas Práticas é evitar a ocorrência de doenças provocadas pelo consumo de alimentos contaminados.

## Cuidados com a Água de irrigação

A utilizada para irrigar o fruto também pode contaminar o fruto. Se ela contiver micro-organismos causadores de doenças, eles podem ser transmitidos para o fruto.

Caso animais tenham acesso à fonte de água, ou fiquem próximos a ela, eles podem defecar e contaminar a água com fezes.



Se a propriedade não possuir um sistema adequado de tratamento de esgoto, este também pode contaminar a água.

## **Quais medidas podem ser tomadas?**

- Sempre que possível utilizar água tratada para realizar a irrigação da produção;
- Manter os canos e mangueiras que levam água até a produção sempre limpos e em bom estado de conservação, para que micro-organismos não se instalem e se multipliquem neles.
- Manter animais afastados das fontes de água;
- Providenciar para que o esgoto seja tratado e tenha um destino adequado, ele nunca deve ser despejado em rios ou lagoas.
- A propriedade deve disponibilizar banheiros limpos e adequados, nunca se deve evacuar na propriedade.

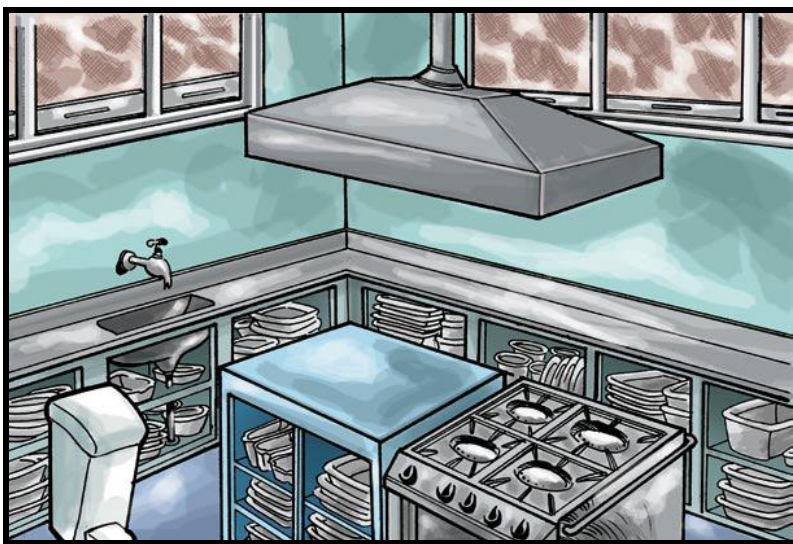


## Como deve ser o local de trabalho?

Para simplificar podemos tomar como exemplo a cozinha da nossa casa.



**ERRADO!**



**CORRETO!**

O local de trabalho deve ser limpo e organizado. Para isso, mantenha o piso, a parede e o teto conservados e sem rachaduras, goteiras, infiltrações, mofo e descascamentos.



Faça a limpeza sempre que necessário e ao final das atividades de trabalho. A sujeira acumulada é ideal para a multiplicação de micro-organismos. Portanto, manipular o fruto em um ambiente sujo é uma forma comum de contaminar o produto. Para se ter uma idéia, uma colher de chá de terra pode conter até 1 milhão de bactérias.

A área de alimentos é atrativa para esses animais, que podem transmitir micro-organismos aos alimentos desprotegidos, ou às superfícies que entram em contato com alimentos. Para impedir a entrada e o abrigo de insetos e outros animais, as janelas devem possuir telas e devem ser retirados os objetos sem utilidade das áreas de trabalho. Os insetos e outros animais apresentam micro-organismos espalhados em todo o corpo.



- Deve haver sempre rede de esgoto ou fossa séptica. As caixas de gordura e de esgoto devem estar localizadas fora das áreas de preparo e de armazenamento de alimentos. A caixa de gordura é a moradia de muitos insetos.

- O local de trabalho deve ser mantido bem iluminado e ventilado. Os micróbios patogênicos se multiplicam rapidamente em locais quentes e abafados.

- As lâmpadas devem estar protegidas contra quebras. Outra ameaça ao consumidor é a contaminação dos alimentos por matérias físicas prejudiciais à saúde, como fragmentos de vidro, pedaços de metais e pedras.

As superfícies que entram em contato com os alimentos, como caixa de coleta, bancadas e mesas, devem ser mantidas limpas e em bom estado de conservação, sem rachaduras, trincas e outros defeitos. Esses defeitos favorecem o acúmulo de líquidos e sujeiras e restos de alimentos, possibilitando que os micróbios patogênicos se multipliquem rapidamente.



Nunca guarde os produtos de limpeza junto com os alimentos. Não utilize produtos de limpeza clandestinos. A limpeza do ambiente é importante para prevenir e controlar baratas, ratos e outras pragas. Os desinfetantes, os detergentes e outros produtos de limpeza contêm substâncias tóxicas que podem contaminar os alimentos.





Os banheiros e vestiários não devem se comunicar diretamente com as áreas de produção. O banheiro deve estar sempre limpo e organizado, com papel higiênico, sabonete, anti-séptico, papel toalha e lixeiras com tampa e pedal.

Como as fezes são altamente contaminadas, os banheiros apresentam um grande número de micro-organismos patogênicos.

Quando vamos ao banheiro e não lavamos as mãos, o número de bactérias entre nossos dedos duplica.



Lave bem as mãos depois de usar o banheiro. Pesquisas indicam que a metade das pessoas esquece-se de lavar as mãos quando sai do banheiro.

### ***Você lava as mãos corretamente?***

#### **Para lavagem correta das mãos siga os seguintes passos:**

1. Utilize a água corrente para molhar as mãos;
2. Esfregue a palma e o dorso das mãos com sabonete, inclusive as unhas e os espaços entre os dedos, por aproximadamente 15 segundos;
3. Enxágüe bem com água corrente retirando todo o sabonete;
4. Seque-as com papel toalha ou outro sistema de secagem eficiente;
5. Esfregue as mãos com um pouco de produto anti-séptico.



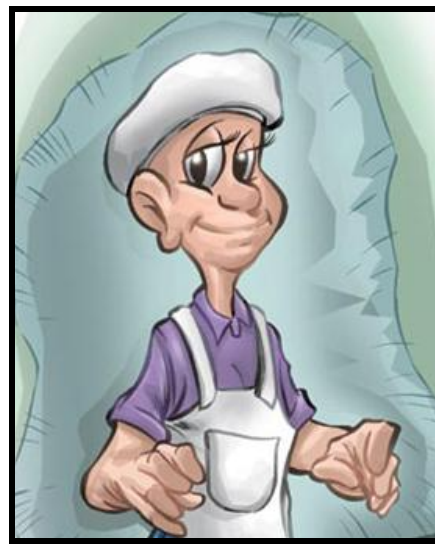
- Áreas frequentemente esquecidas durante a lavagem das mãos
- Áreas pouco esquecidas durante a lavagem das mãos
- Áreas não esquecidas durante a lavagem das mãos

### Atenção!

Ao lavar as mãos, fique atento a alguns cuidados:

- esfregar todas as regiões das mãos (veja a ilustração ao lado com as áreas normalmente esquecidas);
- secar bem as mãos após a lavagem usando papel-toalha ou outro sistema de secagem eficiente.

## Qual é a postura adequada para o produtor?



Esteja sempre limpo. Tome banho diariamente. Há micro-organismos espalhados por todo o nosso corpo. A maior quantidade está no nariz, na boca, nos cabelos, nas mãos (inclusive unhas), nas fezes, no suor e no sapato.

Use cabelos presos e cobertos com redes ou toucas. Se possível não use barba. Os cabelos devem ser mantidos presos para evitar que caiam sobre os alimentos. Você sabia que 1mm de cabelo pode conter até 50.000 micro-organismos?

A roupa utilizada durante o trabalho deve ser usada somente na área de produção. Ela pode servir de transporte de micro-organismos patogênicos para o interior da produção, contaminando-a. Troque sua roupa diariamente, pois ela deve estar sempre limpa e conservada.

Retire brincos, pulseiras, anéis, aliança, colares, relógio e maquiagem. Os adornos pessoais acumulam sujeira e micro-organismos, além de poderem cair nos frutos.

Mantenha as unhas curtas e sem esmalte. Lavar as mãos é uma das melhores formas de evitar a contaminação dos alimentos por micro-organismos patogênicos.

Preste atenção para não fumar, comer, tossir, espirrar, cantar, assoviar, falar demais ou mexer em dinheiro durante o preparo de alimentos.

Como a grande quantidade de micro-organismos patogênicos é encontrada na boca, no nariz e nos ouvidos, fumar, tossir, espirrar, cantar, assoviar ou até falar demais podem contaminar o morango.

Se estiver doente ou com cortes e feridas, não manipule os alimentos, ou se manipular cubra as feridas. A pessoa doente (com diarreia, vômito, gripe, dor de garganta ou conjuntivite) apresenta um alto número de micro-organismos patogênicos em seu corpo que podem facilmente contaminar os alimentos.

Lave bem as mãos antes de manipular o fruto e depois de usar o banheiro, de atender ao telefone e de abrir a porta.

